

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ІЩЕНКО ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 616.43-008.9-056.7:616.2-053.2-092-074/.076-08

ДИСЕРТАЦІЯ

**СТАН РЕСПІРАТОРНОГО МІКРОБІОЦЕНОЗУ
ПРИ МУКОВІСЦИДОЗІ У ДІТЕЙ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ
ОБҐРУНТУВАННЯ ЙОГО КОРЕКЦІЇ**

спеціальність – 222 «Медицина»

галузь знань – 22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Оксана ІЩЕНКО

Науковий керівник – СТЕПАНСЬКИЙ Дмитро Олександрович, доктор медичних наук, професор

Дніпро – 2022 р.

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. Дисертаційна робота також є фрагментом виконання науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету «Визначення рівня протимікробних пептидів при муковісцидозі у дітей» (згідно з Національним дослідницьким грантом Biocodex), термін виконання 12.2021–12.2022 р. р.

Дисертація присвячена важливому компоненту надання медичної допомоги хворим на муковісцидоз (МВ), а саме мікробіологічному супроводу. Мікробіологічний профіль дихальних шляхів підлягає оцінці при комплексному обстеженні пацієнтів з МВ та складанні плану лікування, а також є також важливим для організації заходів інфекційного контролю. Метою даної роботи було 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.

Для вирішення поставлених задач при виконанні дисертаційної роботи проводилося мікробіологічне дослідження зразків з дихальних шляхів з вивченням

морфологічних та тинкторіальних, біохімічних, антагоністичних, адгезивних, біоплівкоутворюючих властивостей отриманих ізолятів та їх профілю хімітеорапевтичної чутливості; імунологічне дослідження мокротиння – визначення концентрації hBD-2 та hCAP-18/LL-37 методом sandwich-ІФА, а також характеру та інтенсивності клітинної інфільтрації в дихальних шляхах з використанням світлової мікроскопії; математико-статистичні. Матеріал – мокротиння, орофарингеальні мазки, промивні води бронхоальвеолярного лаважу (БАЛ), мазки з носоглотки.

У дослідженні взяли участь 32 дитини віком від 2 місяців до 18 років, середній вік включення в дослідження становив 9,26 (0,35) років. Протягом дослідження було зібрано 315 проб з дихальних шляхів. Усі відібрані зразки дали позитивний ріст. Загальна поширеність отриманих ізолятів становила 2,5 на 1 визначення. Загалом у дослідженні отримано 776 унікальних ізоляти.

З використанням розширеного культурального методу в дисертаційній роботі описано стан респіраторного мікробіоценозу при МВ у дітей Дніпровського регіону. В своїй більшості отримані ізоляти належали до філ *Firmicutes* 54,8% ($n = 425$) та *Proteobacteria* 27,6% ($n = 214$). Основними патогенами в дитячому віці були *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Aspergillus fumigatus*, проте відмічена достовірна різниця в якісному складі мікробіому різних вікових груп, $p = 0,027$.

Культуру *Staphylococcus spp.* отримали від усіх пацієнтів, задіяних у дослідженні. Частка *S. aureus* становила 83,7%, коагулазо-негативних видів – по 2-3%. Присутність *S. aureus* негативно корелювала з коагулазо-негативними стафілококами ($p < 0,001$). Сумарно частка неферментуючих грам-негативних мікроорганізмів (НФГНМО) складала 15,6% ізолятів, культури були виділені з третини відібраних проб. Поширеність НФГНМО прогресивно збільшувалася з віком. *Moraxella catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* та *Burkholderia cepacia complex* починали свій вплив в ранньому дошкільному віці, проте роль даних збудників мала достовірну вік-залежну прогресію, $p < 0,001$. При чому поширеність *P. aeruginosa* у віці від 2 до 12 років складала 23,0-28,6%, а у віці старше 15 років – 64,9% ($p < 0,001$). Загалом культура *P. aeruginosa* виділена з 32,7%

($n=103$) проб біологічного матеріалу. Безумовно, такі результати вказують на важке порушення еубіозу дихальних шляхів при МВ вже в дитячому віці.

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% ($p < 0,001$).

На наступному етапі дослідження ми оцінили різницю в таксономічному складі мікробіоти, виділеної з різних рівнів дихальних шляхів ($p < 0,001$). Мікробіом носової порожнини був збіднілим та представленим лише кількома таксономічними одиницями, зокрема *Staphylococcus spp.* ($n = 114$) – 79,1% та родом *Corynebacterium* ($n = 10$) – 6,5%. Мікробне навантаження орофарингеальних мазків та мокротиння було релевантним, $p > 0,05$. На відміну від зразків з носоглотки, з орофарингеальних зразків та мокротиння виділяли *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella spp.*, *V. ceratiae complex*, а також представників *Enterobacterales*.

В науково-дослідній роботі доповнено знання про можливості міжмікробної взаємодії в дихальних шляхах при МВ та показано, що присутність 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 дослідженні описано патогномонічні особливості 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% 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% 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 немукідоїдні до пеніцилінів ($p < 0,001$) та цефалоспоринів ($p < 0,05$).

В дисертаційному дослідженні також 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, $p < 0,001$.

Оскільки використання пробіотиків з метою лікування та профілактики є актуальним питанням сьогодення, а патобіонти, асоційовані з МВ, наділені високими вірулентними властивостями зі здатністю до уникнення дії антибактеріальних сполук, ми вивчили їх перспективу використання в контексті МВ. Симбіонтні культури *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* ($p < 0,05$).

В науково-дослідній роботі вперше 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* ($p < 0,01$).

Тож, в науково-дослідній роботі підтверджено важливість мікробіологічного моніторингу при МВ, як одного з ключових аспектів медичного супроводу. Результати, отримані в роботі, висвітлюють основні мікробіологічні особливості

патобіонтів, асоційованих з МВ, які ускладнюють ефективність етіотропного лікування. Для підвищення якості мікробіологічного супроводу при МВ розроблено методичні рекомендації для роботи з біологічним матеріалом від таких хворих (Перелік наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я. Випуск №8. Реєстр. №104/8/22). Дані стосовно локального профілю чутливості до протимікробних засобів враховуються лікарями клініцистами при призначенні протимікробної терапії. Динаміка показників неспецифічного імунітету в залежності від мікробного профілю дихальних шляхів може бути використана при плануванні протизапальної терапії при МВ у дітей.

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.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Ishchenko O., Koshova I., Borysova I., Stepanskyi D. Microbiological features of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract of children with cystic fibrosis. *Wiad Lek.* 2021; 74 (9cz1): 2094-2099. PMID: 34725282. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)*

2. Ishchenko O. V., Stepanskyi D. O. Microbiological features of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from children with Cystic Fibrosis. *Medicni perspektivi.* 2021; 26 (3):

131–138. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2021.3.242-130> (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*)

3. Ishchenko O, Koshevaya I, Zhernosekova I, Garets V, Stepanskyi D. The Levels of the Human- β -Defensin-2 and LL-37 in the Sputum of Children with Cystic Fibrosis: A Case–control Study and Literature Review. Open Access Maced J Med Sci. 2022; 10(B): 2367-73. DOI: <https://oamjms.eu/index.php/mjms/article/view/10835> (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*)

4. Іщенко О. В., Єфіменко А. О., Андріяшина О., Кошова І. П., Степанський Д. О. Стратегії виживання *Pseudomonas aeruginosa* в дихальних шляхах при муковісцидозі (огляд літератури). Вісник проблем біології та медицини. 2021; 2 (160): 29–34. DOI 10.29254/2077–4214-2021-2-160-29-34 (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*)

5. Іщенко О., Юхименко А., Кошова І., Ільченко С., Степанський Д. Біоплівкотворюючі властивості клінічних ізолятів *Pseudomonas aeruginosa*, виділених від дітей хворих на муковісцидоз, та можливості впливу *Bacillus subtilis* на них in vitro. Морфологія. 2019; №3 (13): 40-47. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.40-47> (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*).

6. Іщенко О. В., Плотнікова М. М., Столєтова Ю. Ю., Шарун О. В., Степанський Д. О. Вплив різних концентрацій пектину на адгезивні властивості клінічних ізолятів, отриманих від хворих на муковісцидоз. Вісник проблем біології і медицини. 2020; № 1 (155): 137-140. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-1-155-137-140. (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*)

7. Ishchenko O., Koshova I., Krushinska T., Kolesnikova I., Stepanskyi D. Culture-dependent evaluation of the respiratory microbiome in children with cystic fibrosis.

EUREKA: Health Sciences. 2022; №4: 39-49. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2022.002568> (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті*).

Наукові праці, які засвідчують апробацію дисертації

8. Ishchenko O., Stepanskyi D., Koshova I., Shtepa O., Kolesnikova I. Features of the Respiratory Microbiome in Children with Cystic Fibrosis. Abstract directory of the Fourth One Health Regional Symposium. Kyiv, 2019; № 241. P. 349 (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез*).

9. Ishchenko O., Stepanskyi D. Microbiological aspects of Pseudomonas aeruginosa infection in children with cystic fibrosis. ESCMID eLibrary. 31-st ECCMID, 9-12 July, 2021.: 1489 (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез*).

10. Ishchenko O., Koshova I., Stepanskyi D. Mucosal antimicrobial peptides in the sputum of children with cystic fibrosis. ESCMID eLibrary. 32-st ECCMID (Lisbon, Portugal), 23-26 April 2022. 2022: 2698 (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез*).

11. Stepanskiy D., Ishchenko O., Andriiashyna O., Krushynska T. Fungal infections in children with Cystic Fibrosis – One centre study. World Microbe Forum, June 2021 (*Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, підготуванні тез*).

12. Іщенко О. В., Кошова І. П., Степанський Д. О. Фенотипічна характеристика ізолятів Pseudomonas aeruginosa, отриманих від дітей, хворих на муковісцидоз. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Респіраторні читання 2021». Дніпро, 18–19 березня 2021 року. 2021: 24 (*Особистий*

внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).

13. Небало П. В., Іщенко О. В. Роль Burkholderia cerasica complex в патогенезі муковісцидозу. Збірник наукових робіт. Матеріали XXI наукової конференції студентів та молодих вчених: Новини та перспективи медичної науки. Дніпро, 2021 рік. 2021: 46-47. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).*

14. Іщенко О., Шарун А., Степанський Д. Стимулювання антагоністичних властивостей нормальної мікробіоти як додатковий фактор протидії антибіотикорезистентності. Збірник тез. Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози (IBTRS), 29 червня – 2 липня 2021 року. 2021: 089 *(Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).*

15. Ishchenko O., Stepanskyi D., Koshova I., Krushinska T. The Role Of Antimicrobial Peptides In Pathogenesis Of Cystic Fibrosis. ASM Microbe. USA, Washington, June 9-13, 2022. – abstract №4036 *(Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).*

16. Ishchenko O., Stepanskyi D. The concentration of hCAP-18/LL-37 and hBD-2 in cystic fibrosis patients. 7-th International Symposium on Antimicrobial Peptides. France, Paris, November 7-9, 2022. — abstract O14. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).*

17. Степанський Д. О., Іщенко О. В., Кошова І. П. Методичні рекомендації з мікробіологічного супроводу дітей з муковісцидозом. Дніпро, 2022 – 44 с. DOI: 10.31612/guidelines-2022-6. *(Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, зборі, аналізі та інтерпретації результатів, підготуванні тексту).*

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 of the department of microbiology, virology, immunology and epidemiology and the 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 dissertation is also a fragment of the research work of the department of microbiology, virology, immunology and epidemiology of the Dnipro State Medical University «Determination of the level of antimicrobial peptides in children with cystic fibrosis in children» (according to the Biocodex National Research Grant), completion date 12.2021 – 12.2022.

The dissertation is devoted to an important component of medical care of patients with cystic fibrosis (CF), namely microbiological support. The microbiological profile of the respiratory tract is evaluated during the complex examination of patients with CF and the planning of a treatment strategy and is also important for the organization of infection control measures. The aim of this work was to boost the clearance of the respiratory pathobionts in children with cystic fibrosis (CF) based on the study of the spectrum of respiratory tract colonizers, their sensitivity to antimicrobial agents, probiotic microorganisms, and environmental conditions.

In order to solve the problems in the dissertation, a microbiological study of the respiratory specimens was carried out with assesment of the morphological and tinctorial, biochemical, antagonistic, adhesive properies and biofilm-forming ability of the obtained isolates and their profile of the sensitivity to antibiotics; immunological examination of sputum was performed with determination of the concentration of hBD-2 and hCAP-

18/LL-37 by the sandwich ELISA as well as assesment of the nature and intensity of cellular infiltration in the respiratory tract using light microscopy; mathematical and statistical methods. The specimens included sputum, oropharyngeal swabs, bronchoalveolar lavage (BAL), nasopharyngeal swabs.

There were 32 children aged 2 months to 18 years enrolled in the study, the average age of inclusion was 9.26 (0.35). During the study, 315 respiratory samples were collected. All collected samples gave growth. The overall prevalence of the obtained isolates was 2.5 per 1 determination. In total, 776 unique isolates were obtained in the study.

With the use of an extended cultural method, the dissertation describes the state of respiratory microbiocenosis in CF-children of the Dnipro region. Most of the obtained isolates belonged to two phyla - *Firmicutes* 54.8% (n = 425) and *Proteobacteria* 27.6% (n = 214). The main pathogens in childhood were *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus*, however, a significant difference in the qualitative composition of the microbiome of different age groups was noted, $p = 0.027$.

The culture of *Staphylococcus spp.* was obtained from all patients involved in the study. The share of *S. aureus* was 83.7%, coagulase-negative species - 2-3% each. The presence of *S. aureus* negatively correlated with coagulase-negative staphylococci ($p < 0.001$). In total, the proportion of the non-fermenting gram-negative microorganisms (NFGNMO) was 15.6%, the cultures were isolated from a one-third of the samples. The prevalence of NFGNMO progressively increased with age. *Moraxella catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Burkholderia cepacia complex* started their influence in early preschool age, however, the role of these pathogens had a proven age-dependent progression ($p < 0.001$). Moreover, the prevalence of *P. aeruginosa* at the age of 2 to 12 years was 23.0-28.6%, and at the age of 15 years - 64.9% ($p < 0.001$). In general, *P. aeruginosa* culture was isolated from 32.7% (n=103) of samples. Undoubtedly, such results indicate a severe violation of eubiosis of the respiratory tract in CF already in childhood.

The repiratory 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% ($p < 0.001$).

At the next stage of the study, we assessed the difference in the taxonomic composition of the microbiota isolated from different levels of the respiratory tract ($p < 0.001$). The microbiome of the nasal cavity was depleted and represented by only a few taxonomic units, in particular *Staphylococcus spp.* ($n = 114$) – 79.1% and the genus *Corynebacterium* ($n = 10$) – 6.5%. The microbial load of oropharyngeal swabs and sputum was relevant, $p > 0.05$. In contrast to samples from the nasopharynx, *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella spp.*, *B. cepacia complex*, as well as representatives of *Enterobacterales* were isolated from oropharyngeal samples and sputum.

In the study we expanded the knowledge about microbial interactions in the CF-respiratory tract of children and shown that the presence of NFGNMO has a negative impact on the 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, *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 variant (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 ($p<0.001$).

Since the use of probiotics for the purpose of treatment and prevention is a relevant issue today, and the pathobionts associated with CF are endowed with high virulence properties and the ability to evade the action of antibacterial compounds, so we studied their prospective in the context of CF. 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* ($p<0.05$).

In a research paper, the concentration of antimicrobial peptides (AMP) hBD-2 and hCAP-18/LL-37 in the sputum of children with CF was determined for the first time, and the dependence of the level of cathelicidin hCAP-18/LL-37 in the airways of CF with colonization was shown *P. aeruginosa* ($p < 0.01$).

Therefore, the research confirmed the importance of microbiological monitoring in CF 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 CF. The authors designed the methodological recommendations for working with biological

material from CF patients at all stages of microbiological research (List of scientific (scientific and technical) products intended for the implementation of the achievements of medical science in the field of health care. Issue No. 8. Register. No. 104/ 8/22). 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 CF.

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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	18
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 РОЛЬ МІКРОБНОГО ФАКТОРУ ПРИ МУКОВІСЦИДОЗІ У ДІТЕЙ (огляд літератури)	30
1.1. Сучасний стан проблеми муковісцидозу в світі та Україні	30
1.2. Патофізіологічна концепція розвитку та прогресування муковісцидозу	36
1.3. Мікробна етіологія прогресування хвороби	38
1.4. Фактори, що зумовлюють становлення хронічної інфекції при муковісцидозі	49
1.5. Роль факторів вродженого імунного захисту в патогенезі муковісцидозу	54
1.6. Сучасні підходи до корекції респіраторного мікробіому при муковисцидозі	63
1.7. Особливості мікробіологічного моніторингу при муковісцидозі	74
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	78
2.1. Дизайн дослідження	78
2.2. Загальна характеристика пацієнтів задіяних в дослідженні	79
2.3. Методи дослідження	81
2.3.1. Виділення чистої культури та її ідентифікація	81
2.3.2. Визначення чутливості до протимікробних засобів	85
2.3.3. Визначення антагоністичних властивостей пробіотичних культур по відношенню до патобіонтів асоційованих з МВ	86
2.3.4. Визначення адгезивних властивостей отриманих культур	87

2.3.5	Визначення біоплівкоутворюючих властивостей отриманих культур	88
2.3.6.	Визначення рівня протимікробних пептидів в мокротинні	90
2.4.	Методи статистичного аналізу отриманих результатів	92
РОЗДІЛ 3	МІКРОБНИЙ ПРОФІЛЬ РЕСПІРАТОРНОГО ТРАКТУ ДІТЕЙ ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ	93
3.1.	Стан коменсальної мікробіоти дихальних шляхів при муковісцидозі у дітей	93
3.2.	Вікові особливості мікробного профілю дихальних шляхів при муковісцидозі	96
3.3.	Особливості мікробного профілю дихальних шляхів відповідно до екологічної ніші	100
3.4.	Узагальнення результатів дослідження	102
РОЗДІЛ 4	БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ	107
4.1.	Мікробіологічні особливості основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом	107
4.2.	Профіль хіміотерапевтичної чутливості основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом	119
4.2.1	Профіль чутливості <i>Staphylococcus aureus</i>	119
4.2.2	Профіль чутливості <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	123
4.2.3	Профіль чутливості <i>Burkholderia cepacia complex</i>	126
4.2.4	Профіль чутливості <i>Enterobacterales</i>	129
4.2.5	Профіль чутливості грибів	130
4.3.	Адгезивні властивості культур основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом	131
4.4.	Біоплівкоутворюючі властивості культур основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом	132
4.4.1	Біоплівкоутворюючі властивості <i>Staphylococcus aureus</i>	133

	17
4.4.2 Динаміка утворення біоплівки клінічними ізолятами <i>P. aeruginosa</i> в закритій системі <i>in vitro</i>	136
4.5 Антагоністичний вплив пробіотичних культур на патобіоти асоційовані з муковісцидозом у дітей	139
4.5.1 Мікробіологічна характеристика аутосимбіонтів <i>Aerococcus spp.</i> , виділених з дихальних шляхів дітей хворих на муковісцидоз	140
4.5.2 Антагоністичний вплив аутосимбіонтів роду <i>A. viridans</i> на патогенні культури, виділені з дихальних шляхів дітей, хворих на муковісцидоз	141
4.5.3 Антагоністичний вплив пробіотичних мікроорганізмів роду <i>Bacillus</i> на патогенні культури, виділені з дихальних шляхів дітей хворих на муковісцидоз	143
4.6 Узагальнення результатів дослідження	143
РОЗДІЛ 5 РОЛЬ ФАКТОРІВ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУННОГО ЗАХИСТУ В ПАТОГЕНЕЗІ МУКОВІСЦИДОЗУ У ДІТЕЙ	150
5.1 Концентрація hBD-2 та hCAP-18/LL-37 в мокротинні при МВ	150
5.2 Взаємозв'язок характеру запалення в дихальних шляхах з концентрацією протимікробних пептидів та мікробною колонізацією	152
5.3. Узагальнення результатів дослідження	153
ВИСНОВКИ	155
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	158
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	159
ДОДАТКИ	181

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ

95%ДІ	– 95% довірчий інтервал
BCSA	– <i>Burkholderia ceracia</i> селективний агар
EnaC	– Натрієвий епітеліальний канал
EUCAST	– Європейський комітет з тестування на чутливість до антибіотиків, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
hBD-2	– Людський β -дефензин-2
hCAP-18/LL-37	– Людський кателіцидин LL-37
IL	– Інтерлейкін
M	– Стандартна похибка середньої величини
MRSA	– Метицилін-резистентний <i>Staphylococcus aureus</i>
R	– Коефіцієнт кореляції Спірмена
SAP	– Аспарагінові протеази
TNF- α	– Фактор некрозу пухлин- α
χ^2	– Критерій Хі-квадрат Пірсона
АМП	– Антимікробні пептиди
АТФ	– Аденозинтрифосфат
АФК	– Активні форми кисню
БАЛ	– Бронхоальвеолярний лаваж

БЛРС	– В-лактамази розширеного спектру
еДНК	– Позаклітинна ДНК
ІАМ	– Індекс адгезивності мікроорганізмів
ІФА	– Імуноферментний аналіз
КУЕ	– Коефіцієнт участі еритроцитів
М	– Середня арифметична величина
МАМП	– Мікроорганізм-асоційовані молекулярні патерни
МВ	– Муковісцидоз
МДК	– Мультидисциплінарна команда
Me	– Медіана
МКФ	– Малі колоніальні форми, small colony variants
МПА	– М'ясо-пептонний агар
МХА	– Агар Мюллера-Хінтона
НТМ	– Нетуберкульозні мікобактерії
НФГНМО	– Неферментуючі грам-негативні мікроорганізми
ПЛР	– Полімеразна ланцюгова реакція
ПМА	– Полісахаридний міжклітинний адгезин
ПРР	– Патерн-розпізнаючі рецептори
РПЄТМВ	– Реєстр пацієнтів Європейського Товариства Муковісцидозу, European Cystic Fibrosis Society Patients Registry
СПА	– Середній показник адгезії

ТРБМ	– Трансміембранний регуляторний білок муковісцидозу
ТСБ	– Триптозно-соевий бульйон
ФД	– Фармакодинаміка
ФК	– Фармакокінетика

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Муковісцидоз (МВ) є моногенним захворюванням, на яке страждають щонайменше 100 000 людей у всьому світі [1]. За офіційною статистикою на кінець 2021 року в Україні на обліку перебувало 615 дітей з МВ, з них 52 з вперше в житті встановленим діагнозом [2]. Завдяки досягненню сучасної медичної науки середня очікувана тривалість життя таких хворих у розвинених країнах становить близько 51,7 (95%ДІ 50,0–53,4) років, проте все ще залишається нижче, ніж в загальній популяції [3]. Причиною захворювання є мутації в гені трансмембранного регуляторного білку муковісцидозу (ТРБМ), який функціонує як хлорний канал на апікальній поверхні епітеліальних клітин і забезпечує транспорт хлору та бікарбонатів. Такий дефект призводить до дегідратації та ацидифікації слизових оболонок, і, як наслідок, появи в'язкого секрету екзокринних залоз. В дихальних шляхах виникає порушення мукоциліарного кліренсу з подальшим розвитком порочного кола «хронічне запалення – хронічна інфекція», в патогенезі якого неможливо визначити первинний компонент [1]. І хоча середня очікувана тривалість життя при МВ продовжує зростати завдяки доступності антибіотиків та модуляторів ТРБМ, різні інфекційні агенти і сьогодні залишаються безпосередньою загрозою [4]. Типові мікроорганізми, які виділяють від пацієнтів з МВ, наділені особливими факторами вірулентності, зокрема стійкістю до антибіотиків, високими адгезивними та біоплівко-утворюючими властивостями. Поява мутантних фенотипів зі зміненими культуральними властивостями потребує особливої уваги, адже пов'язана зі складнощами індикації та ідентифікації патогена [5].

Не виключено, що мутації в гені ТРБМ пов'язані не тільки з дефектом транспорту іонів та рідини, але також з додатково наслідованою модуляцією вродженого імунітету. Дисфункція епітелію та мукоциліарного кліренсу поряд з дисрегуляцією продукції цитокінів, хемокінів та накопиченням нейтрофілів в тканині легень є невід'ємними складовими патогенезу МВ. Беручи до уваги захисні

прозапальні властивості протимікробних пептидів, можна очікувати, що вони відіграють одну з ключових ролей в патогенезі хвороби легень при МВ. Людські β -дефензини та кателіцидин є двома основними сімействами антимікробних пептидів (АМП), які експресуються епітеліальними клітинами тіла людини, в тому числі дихальних шляхів. Людський β -дефензин-2 (hBD-2) є індукцибельним пептидом з відомою активністю проти грам-негативних патогенів. Кателіцидин (hCAP-18/LL-37) – це мажорний білок нейтрофільних гранул з синергічними до дефензинів властивостями. Зазвичай публікації щодо концентрації АМП при МВ стосуються сироватки крові та слини, проте дослідження мокротиння розширило б розуміння патологічного процесу саме у дихальних шляхах [6, 7, 8].

Надання медичної допомоги хворим на МВ вимагає мультидисциплінарного підходу з використанням найкращих доступних практик. Мікробіологічний профіль пацієнта враховується при комплексній оцінці стану дихальної системи та складанні плану лікування, проте є також важливим і для організації інфекційного контролю в закладах охорони здоров'я (ЗОЗ), що надають допомогу хворим на МВ [1, 9].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 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 рр. Дисертаційна робота також є фрагментом виконання науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету «Визначення рівня протимікробних пептидів при муковісцидозі у дітей» (згідно з Національним дослідницьким грантом Biocodex), термін виконання 12.2021–12.2022 рр.

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.

Завдання дослідження:

1. Вивчити склад респіраторного мікробіому при МВ у дітей.
2. Вивчити біологічні властивості патогенів, асоційованих з МВ – морфологічні, тинкторіальні, біохімічні, адгезивні та біоплівкоутворюючі.
3. Вивчити профіль хіміотерапевтичної чутливості респіраторних патогенів, асоційованих з МВ.
4. Вивчити антагоністичні властивості аутосимбіонтів *A. viridans* дихальних шляхів та несимбіонтних пробіотичних штамів проти патогенів, асоційованих з МВ.
5. Визначити взаємозв'язок коливань концентрації hBD-2 та кателіцидину hCAP-18/LL-37 в мокротинні у дітей з МВ з мікробним профілем та клітинним маркерами конститутивного імунітету.

Об'єкт дослідження: мікробіота респіраторного тракту та складові конститутивного імунітету дітей, хворих на МВ.

Предмет дослідження: мікробіологічні особливості мікроорганізмів, що колонізують дихальні шляхи дітей, хворих на МВ, концентрація hBD-2 та hCAP-18/LL-37 в респіраторному секреті.

Методи дослідження: мікробіологічне дослідження зразків з дихальних шляхів з вивченням морфологічних та тинкторіальних, біохімічних, антагоністичних, адгезивних, біоплівкоутворюючих властивостей отриманих ізолятів та їх профіль чутливості до антибіотиків; імунологічне дослідження мокротиння – визначення концентрації hBD-2 та hCAP-18/LL-37 методом sandwich-ІФА, а також характеру та інтенсивності клітинної інфільтрації в дихальних шляхах з використанням світлової мікроскопії; математико-статистичні. Матеріал – мокротиння, орофарингеальні мазки, промивні води бронхоальвеолярного лаважу (БАЛ), мазки з носоглотки.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.

В дисертаційній роботі 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 міжмкробної 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 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 (Перелік наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я. Випуск №8. Реєстр. №104/8/22). 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.

Результати, отримані при проведенні науково-дослідної роботи, впроваджені в науково-освітній процес кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України (Протокол №7 від 28.12.2022) та кафедри мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології і медико-біологічної фізики й інформатики Дніпровського державного медичного університету (Протокол №3 від 15.12.2022).

Особистий внесок здобувача.

Формулювання ідеї, планування етапів роботи, визначення мети та задач дослідження, обговорення результатів, що були отримані, проводилося разом з науковим керівником, д. мед. н., професором Д. О. Степанським. Дисертантом особисто виконані патентно-інформаційний пошук і проаналізована література по даній проблемі. Здобувачем проведено відбір пацієнтів з МВ, їх мікробіологічне обстеження та інтерпретацію результатів, проведені систематизація і статистичний аналіз отриманих даних. Здобувачем самостійно написані всі розділи дисертації, сформульовані висновки і рекомендації. Дослідження проводилися на базі кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДДМУ. Обладнання та набори для біохімічної ідентифікації отриманих культур було придбано за підтримки Дніпровського державного медичного університету. Обладнання та набори для імунологічного дослідження були придбані на кошти гранту від U.S.-Ukraine

Foundation (Біотехнологічна ініціатива Фондації «Україна-США») та Національного дослідницького гранту від BIOCODEX (Франція).

Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності (академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації).

За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертації не було виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації, що підтверджено висновком комісії з виявлення та запобігання плагіату Дніпровського державного медичного університету встановила 95,2 % оригінальності тексту.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на 31-му Конгресі Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних захворювань (ECCMID, м. Базель (on—line), 2021), Всесвітньому мікробному форумі (World Microbe Forum ASM/ESCMID, м. Вашингтон (on-line), 2021), 19-й літній школі Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних хвороб (м. Каркавелуш (Португалія), 2021), 32-му Конгресі Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних захворювань (ECCMID, м. Лісабон (Португалія), 2022), Всесвітньому мікробному форумі (World Microbe Forum ASM, м. Вашингтон (on-line), 2022), науковій конференції Chance for science (on-line, 2022), 7-му міжнародному симпозиумі з протимікробних пептидів (м. Париж (Франція), 2022), 4-му Регіональному симпозиумі в рамках програми Єдине здоров'я (м. Київ, 2019), Міжнародному симпозиумі зі зменшення біологічної загрози (м. Київ (on-line), 2021), науково-практичній конференції «Респіраторні читання» (м. Дніпро (онлайн), 2021), засіданні Асоціації клінічних мікробіологів (м. Дніпро (онлайн), 2021).

Здобувач отримала наступні зарубіжні гранти:

1. Грант на відвідування 19-ї літньої школи Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних хвороб, м. Лісабон (Португалія). Вересень, 2021 рік.

2. Грант на відвідування Immunogenomics of Disease: Accelerating to Patient Benefit Biotech Initiative, the U.S.-Ukraine Foundation (Біотехнологічна ініціатива Фундації «Україна-США»). Он-лайн. Лютий, 2021 рік.

3. Грант на дослідження Biotech Initiative, the U.S.-Ukraine Foundation (Біотехнологічна ініціатива Фундації «Україна-США»). Квітень, 2021 р.

4. Національний дослідницький грант Biocodex (Франція). Грудень, 2021 р.

5. Тревел-грант на відвідування 32-го Конгресу Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних захворювань, м. Лісабон (Португалія). Квітень, 2022 рік.

6. Грант на відвідування семінару Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних хвороб «The challenge of persistent biofilm-related bone and joint infections», м. Цюрих (Швейцарія). Травень, 2022.

7. Грант Федарації європейських мікробіологічних товариств на відвідання 7-го міжнародного симпозіуму з антимікробних пептидів, м. Париж (Франція). Листопад, 2022.

Публікації.

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 журналах, 9 тез доповідей у матеріалах конгресів та науково-практичних конференцій, 1 методичні рекомендації.

Обсяг і структура дисертації.

Дисертація викладена на 185 сторінках друкованого тексту, з яких 176 сторінок займає основний текст, та складається зі вступу, огляду літератури, розділу методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, методичних рекомендацій і списку використаної літератури, який містить 180 джерел, з них 160 латиною та 20

кирилицею, а також з 1-го додатку. Робота ілюстрована 9 таблицями та 47 рисунками.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ МІКРОБНОГО ФАКТОРУ ПРИ МУКОВІСЦИДОЗІ У ДІТЕЙ

(огляд літератури)

Мікробний профіль дихальних шляхів є одним з ключових аспектів при комплексному обстеженні дітей хворих на МВ. Обґрунтований підхід до призначення профілактичного та елімінаційного протимікробного лікування вимагає надійних результатів мікробіологічного моніторингу. Успіх хіміотерапевтичного лікування та ефективні протиепідемічні превентивні заходи є запорукою покращення якості життя при МВ та збільшення його очікуваної тривалості.

1.1 Сучасний стан проблеми муковісцидозу в світі та Україні

МВ є спадковою патологією з аутосомно-рецесивним типом успадкування, що зустрічається в усіх етнічних групах. В популяції європейського походження частота захворювання коливається в межах 1:2500 – 1:3500 новонароджених, що відповідає показникам носійства алельного гена 1:28 – 1:40 [1, 3, 9]. У Європейському регіоні частота МВ складає від 1:1353 в Ірландії до 1:25000 у Фінляндії і становить у середньому 1:4500 у Західній Європі, та 1:6000 у Північній та Центральній Європі. Частота захворювання в Австралазії, Канаді та США становить 1:3000, 1:3300 і 1:4000 відповідно [4]. Проте в інших регіонах світу захворювання зустрічається набагато рідше. У Латинській та Південній Америці захворюваність важко оцінити через відсутність національних реєстрів, а також через високу етнічну різноманітність населення. Середня частота становить приблизно від 1:8000 до 1:10 000, коливаючись від 1:6100 в Аргентині до 1:15 000 в Коста-Ріці [4, 10]. На Близькому Сході (де кровна спорідненість висока) частота МВ є вищою, ніж у Східній Азії. Захворюваність коливається від 1:2560 в Йорданії до 1:350 000 в Японії і, за оцінками, становить від 1:10 000 до 1:100 000 в Індії. Відповідні дані про народи Африки дуже обмежені [10].

Динаміку епідеміології захворювання можна відстежувати за допомогою надійних інструментів, таких як реєстри пацієнтів, які включають інформацію, втому числі, й про демографічні та клінічні характеристики популяції [4, 11, 12, 13].

За даними Реєстру пацієнтів Європейського товариства муковісцидозу (РПЄТМВ) станом на 2018 рік в Європейському регіоні було зареєстровано близько 50 тис. хворих на МВ. Інформація про демографічні та клінічні дані у відповідності до узгоджених критеріїв використовується для оцінки, дослідження та порівняння аспектів МВ в 38 країнах-учасниках. Проте, навіть такі дані не є універсальними через особливості національного нагляду в різних країнах. Серед країн, які мають свій Національний реєстр пацієнтів з МВ Бельгія, Чехія, Франція, Данія, Німеччина, Угорщина, Ірландія, Ізраїль, Італія, Нідерланди, Норвегія, Швейцарія, Великобританія тощо. Розрахункове покриття епідеміологічного нагляду є найбільшим у Великобританії та Данії, де складає 99%, а серед більшості європейських країн знаходиться в межах 80-95%, за виключенням Польщі (60%), Туреччини (60%), Литви (52%), Румунії (50%) та України – лише 23% [6]. Дані, що висвітлюють основні показники епідеміологічного нагляду за МВ наведені в табл.1.1.

Таблиця 1.1

**Дані щорічних звітів національних реєстрів пацієнтів з
МВ в Європейському регіоні [12]**

Дані надані РПЄТМВ	Пацієнти, n	Медіана віку на обліку, років	≥18 р, %	Хронічна інфекція Pa, %
Україна (1 центр)	212	10,9 (6,4; 16,9)	80,48	39,67
Польща (12 центрів)	1242	12,3 (6,5; 19,5)	70,11	12,90
Словенія (3 центри)	113	18,0 (9,0; 26,3)	50,44	21,82
Угорщина	528	18,0 (9,3; 18,0)	49,81	29,20
Німеччина	6481	21,4 (11,0; 32,5)	41,92	9,75

Продовження табл. 1.1

Франція	6729	21,5 (19,9; 32,7)	40,82	7,88
Великобританія	10655	21,2 (10,3; 32,5)	42,83	6,06
В регіоні	50902	19(9,4; 30,9)	47,62	12,81

Примітка. *Pa* – *P. Aeruginosa*

За даними РПСТМВ, в 2018 році наша країна повідомляла про 212 пацієнтів, з яких 80,48% діти [11]. Проте такі свідчення навряд чи відображають істину поширеність захворювання в Україні, адже надані лише єдиним Західноукраїнським спеціалізованим дитячим медичним центром. Істинна кількість хворих на МВ в Україні залишається невідомою, проте розрахункова кількість складає 1700 – 4000 осіб. Згідно з офіційними джерелами, в 2021 році було зареєстровано 796 хворих на МВ, них дітей – 77,26%, $n = 615$ [2]. Проте через переривчастий характер програми масового неонатального скринінгу щорічне оновлення даних є складним з огляду на відтермінування клінічного діагностування патології [9].

Коли хворобу вперше описала *Дороті Х. Андерсон* у 1938 році, пацієнти зазвичай помирали на першому році життя [4]. Але досягнення сучасної медичної науки в лікуванні та веденні таких хворих суттєво змінили епідеміологічну характеристику патології [3, 4]. За останнє десятиліття в більшості країн світу значно покращилася ситуація з захворюваності та смертності при МВ, і в розвинених країнах частка дорослих пацієнтів перевищує частку дітей, а середня очікувана тривалість життя наближається до 55 років для пацієнтів, які сьогодні досягли віку 30 років, і перевищує 60 років для пацієнтів, які досягли 40 років [4]. В європейських країнах середня очікувана тривалість життя сьогодні складає 51,7 років (95%ДІ 50,0–53,4) [14]. Наведений прогноз виглядає оптимістично, але, насправді, є дуже реальним. Нещодавно була розроблена динамічна прогностична модель, що проводить персоналізовану оцінки виживання, використовуючи дані національного реєстру Великобританії. На основі 16 предикторів модель здатна передбачити виживання до 10 років для пацієнтів до віком до 50 років [15, 16]. Але, на жаль, в багатьох країнах світу рубіж в 34 роки залишається метою, яку ще необхідно

здолати. Середня очікувана тривалість життя в Україні складає 12 – 15 років, а отже, є суттєво меншою ніж в інших країнах, що розвиваються, та розвинених країнах [1].

Багато факторів є важелями таких важливих досягнень в епідеміології захворювання, зокрема стандартизація лікування, ведення пацієнтів у спеціалізованих центрах міждисциплінарними командами, рання діагностика через неонатальний скринінг, доступ до таргетного лікування, а також контроль колонізації *P. aeruginosa* [17].

Мікроорганізм *P. aeruginosa* визнано одним з найбільш прогностично значущих патогенів, що колонізують нижні дихальні шляхи при МВ, і основною причиною захворюваності та смертності. На сьогодні доведено, що, чим довше пацієнт залишається вільним від *P. aeruginosa*, тим довшою залишається середня очікувана тривалість життя [18, 19]. Серед основних причин смертності при МВ провідною являється саме прогресивне ураження легень агресивними патогенами з високими адгезивними властивостями та стійкістю до протимікробних засобів [12].

Епідеміологія МВ постійно змінюється, й, хоча, *P. aeruginosa* та *S. aureus* залишаються основними патогенами, поширеність інфікування нетуберкульозними мікобактеріями та *Stenotrophomonas maltophilia* помірними темпами зростає [5]. За даними РПЄТМВ, в Європейському регіоні близько 13% хворих на МВ мають хронічну інфекцію *P. aeruginosa*. Поширеність інфекції різниться між країнами і становить від 2,68% в Норвегії до 59,09% в Молдові. Хронічну інфекцію *S. aureus* мають 36,28% пацієнтів на обліку. Найнижчі показники повідомляла Бельгія – 0%, найбільші – Молдова і Словенія – 90,91% і 92,73% відповідно. Поширеність MRSA серед пацієнтів в Європейському регіоні становить від 0 до 22% [12].

Тож, поширеність та захворюваність патобіонтів асоційованих з МВ, зокрема *P. aeruginosa*, *S. aureus*, а також *B. cepacia complex*, є значно вищою серед країн з низьким та середнім рівнем прибутку [5, 12, 13]. Й хоча, щорічна динаміка *P. aeruginosa* має негативну направленість, ця різниця є відчутною в молодших вікових групах в країнах з низьким рівнем прибутку та в старших вікових групах в країнах з високим рівнем прибутку. Поширеність *S. aureus* є високою серед усіх країн, а серед молодших вікових груп в країнах з низьким та середнім рівнем

прибутку щорічний приріст складає 1% [5]. За різними оцінками при досягненні 18 років життя близько 80% пацієнтів набувають інфекції *P. aeruginosa* [20].

Агресивне лікування бронхолегеневої інфекції антибіотиками сприяло збільшенню очікуваної тривалості життя, але в той же час, справляло селективний вплив на розвиток множинної лікарської стійкості [21]. Стійкість до антибіотиків при МВ є багатофакторною проблемою, яка включає аспекти, пов'язані з фізіологією мікроорганізмів (формування біоплівки), генетичною еволюцією (набуття мутацій стійкості до антибіотиків, пов'язаних з фенотипами мутаторів) та епідеміологією (наприклад, інфікування мікроорганізмами зі множинною лікарською стійкістю або епідемічним штамом) [22, 23]. В дослідженнях встановлено зв'язок множинної стійкості до антибіотиків зі зменшенням мікробного різноманіття в дихальних шляхах, збільшенням відносної кількості НФГНМО, зниженням легеневої функції.

Протягом багатьох років парадигма інфікування полягала у тому, що пацієнти з МВ набувають інфекцію *P. aeruginosa* з оточуючого середовища і, отже, мають власні індивідуальні клони. Протягом останніх двох десятиліть в численних дослідженнях продемонстровано, що хворі, які відвідують одні й ті ж центри МВ, мають спільні штами *P. aeruginosa* [22, 23, 24]. Сьогодні завдяки сучасним молекулярно-генетичним методам ідентифіковано широкий ряд епідемічних штамів з потенційно вищою трансмісивністю, клінічною агресивністю, резистентністю до протимікробних препаратів і біоплівкоутворюючими властивостями. Окрім того, пацієнти з епідемічними штамми *P. aeruginosa*, мають менше мікробне різноманіття в дихальних шляхах в порівнянні з хворими, від яких виділяють неендемічні клони [24]. Про виділення епідемічних клонів повідомляли в різних країнах світу, зокрема в Канаді, США та Австралії [24, 25, 26]. В Європі існування таких клонів задокументовано в Великобританії (Манчестер, Ліверпуль, Мідлендс, Сток-он-Трент, Шеффілд, Лідс), Данії, Нідерландах. Виявлення епідемічних штамів *P. aeruginosa* спонукало до організації специфічних заходів інфекційного контролю в закладах охорони здоров'я, які надають допомогу хворим на МВ, зокрема сегрегації пацієнтів [22, 25, 27-30]. Аналогічно до *P. aeruginosa*, повідомлялося про

виділення епідемічних клонів *B. cerasia complex*. Типування на основі мультилокусних послідовностей використовується для відстеження глобальної епідеміології *B. cerasia complex*. Показано, що штами *B. ceno-cerasia* з високою трансмісивністю, такі як штам ET-12 (ST-28) і чеський штам (ST-32) епідемічно поширилися серед пацієнтів з МВ у Канаді та Європі [31].

В контексті надання медичної допомоги хворим на МВ не можливо оминати й економічні питання, адже витрати на лікування суттєво вище, ніж при більшості інших хронічних захворювань. Витрати на отриманий рік життя зменшуються, якщо в країні імплементовані успішні превентивні стратегії затримки появи хронічної інфекції, використовуються модулятори ТРБМ, адекватна підтримуюча базисна респіраторна терапія. Наприклад, у Великобританії відтермінування колонізації *P. aeruginosa* на 1 рік дозволяє заощадити більше € 25 000 на пацієнта, що еквівалентно різниці в середніх річних витратах для хронічно інфікованих в порівнянні з неінфікованими. Програми профілактики для німецьких пацієнтів з МВ віком до 18 років, які дозволяють відстрочити початок інфекції на 1 рік, допомагають вийти на рівень беззбитковості з досягненням економії у цій віковій групі по цій нозології [1]. І тим не менш, за підрахунками, в середньому щорічна вартість лікування одного пацієнта становить близько \$15 тис. і залежить від важкості перебігу захворювання, тож, складає \$10 тис., \$25 тис. і \$33 тис. для легкого, середнього і важкого. Більшість з цих коштів витрачаються безпосередньо на госпіталізацію – 58%, лікарські засоби – 29%, медичні послуги – 10% та діагностичні процедури – 1% [32]. Міністерство охорони здоров'я України бере на себе частину витрат, які необхідні на лікування, але економічний тягар для родини залишається великим.

Тож, на сьогодні Україна знаходиться на шляху організації якісного медичного супроводу дітям, хворим на МВ. Проте нині захворювання залишається гострою медичною та соціальною проблемою, вирішення якої має бути комплексним. Вплив на мікробіологію захворювання має одне з вирішальних значень для пацієнтів та їхніх сімей. Якісний мікробіологічний моніторинг є запорукою максимально тривалого збереження легеневої функції, а отже –

позитивного впливу на якість та очікувану тривалість життя пацієнтів, зменшення навантаження на систему охорони здоров'я та витрат на лікування.

1.2 Патофізіологічна концепція розвитку та прогресування муковісцидозу

МВ є моногенним захворюванням з аутосомно-рецесивним типом успадкування, причиною якого є мутації в обох алелях гена локалізованого на довгому плечі хромосоми 7 (7q31), який кодує синтез трансмембранного регуляторного білка МВ (ТРБМ) [33].

Відкриття гена, відповідального за експресію ТРБМ 30 років тому стало важливою віхою в історії МВ. Це дало знання про патофізіологію захворювання, сприяло покращенню діагностики та лікування хворих та проклало шлях до ефективних терапевтичних підходів та появи таргетних методів лікування [10].

В нормі ТРБМ функціонує як цАМФ-залежний іонний канал, який активується фосфорилюванням, і опосередковує транспорт хлоридів та бікарбонатів через апікальну поверхню епітелію дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, вивідних протоків потових залоз тощо. У пацієнтів з МВ дисфункція ТРБМ призводить до дегідратації та ацидифікації поверхні слизових оболонок та, як наслідок, обтурації люмінальних компартментів і вивідних протоків в'язким слизом. Результатом таких патофізіологічних змін при МВ є ураження багатьох органів і систем, зокрема легень, кишечника, підшлункової залози. В дихальних шляхах недостатня ТРБМ-опосередкована секреція аніонів також пов'язана з підвищеним всмоктуванням натрію та рідини натрієвими каналами (epithelial sodium channel, ENaC) (рис. 1.1). Такі дефекти іонного транспорту при МВ призводять до зневоднення поверхні дихальних шляхів і порушення мукоциліарного кліренсу. Такі патофізіологічні процеси створюють основу для прогресуючого муко-обструктивного захворювання легень з подальшою мікробною колонізацією та запаленням, які залишаються основною причиною захворюваності та смертності пацієнтів із МВ [33, 34].

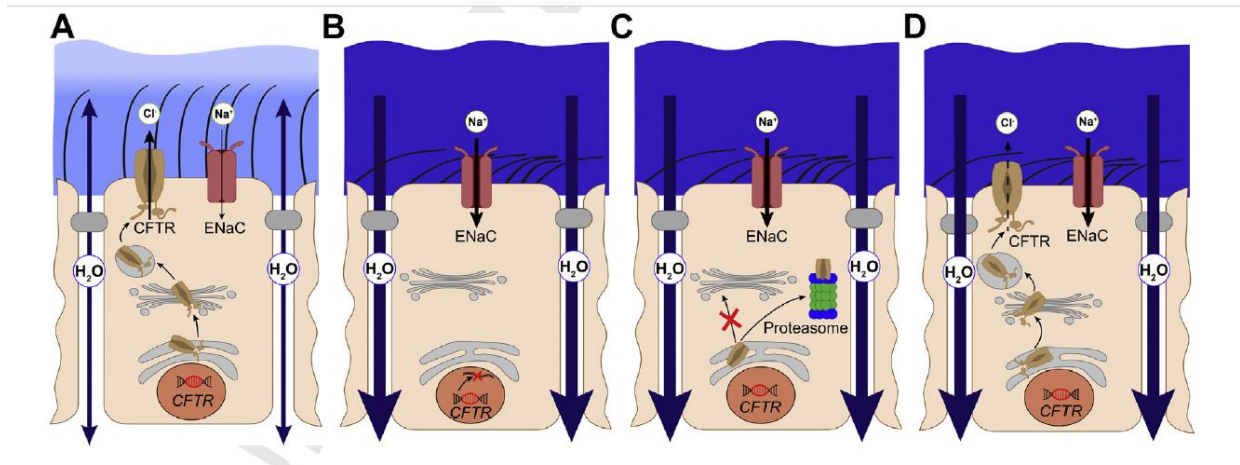


Рис. 1.1 Роль ТРБМ в здорових дихальних шляхах та молекулярні механізми, викликані дисфункцією ТРБМ при МВ [33]

До рис. 1.1. А. В здорових дихальних шляхах ТРБМ експресується разом з ЕНаС на апікальній поверхні епітеліальних клітин дихальних шляхів. ТРБМ відіграє центральну роль у цАМФ-опосередкованій секреції іонів (хлорид і бікарбонат) та рідини, а ЕНаС обмежує всмоктування натрію та рідини через епітелій дихальних шляхів. Спільна регуляція ТРБМ та ЕНаС забезпечує належну гідратацію поверхні дихальних шляхів та ефективний мукоциліарний кліренс. В – нонсенс-мутації в гені ТРБМ або мутації сплайсингу блокують експресію. С – міссенс-мутації, порушують правильне збирання ТРБМ і призводять до утримання білка в ендоплазматичному ретикулумі та деградації протеасомою. D – деякі міссенс-мутації та мутації сплайсингу утворюють канали ТРБМ, які досягають поверхні клітини, але не є повністю функціональними через ряд дефектів.

На сьогодні ідентифіковано понад 2000 унікальних варіантів ТРБМ, причому видалення фенілаланіну в позиції 508 (*F508del*) є найпоширенішою мутацією, її частка становить приблизно 70%. Серед хворих на МВ зустрічаються гомозиготи і компаундні гетерозиготи. Важкий перебіг захворювання, з ранньою маніфестацією легневих проявів і раннім інфікуванням *P. aeruginosa*, зниженням нутритивного статусу і ураженням печінки є характерним для хворих, гомозиготних по мутації *F508del*, у порівнянні з іншими мутаціями [19, 35].

Генетичний дефект ТРБМ, окрім прямого впливу та реологію секретів залоз зовнішньої секреції організму, несе з собою додатково наслідований дефект вродженого імунітету. Мікробна колонізація дихальних шляхів призводить до нерегульованого місцевого та системного запалення. Результатом дії цитокінів, хемокінів та хемоатрактантів є накопичення нейтрофілів в легенях з подальшою стимуляцією запального процесу та прямим пошкодженням тканини легень. Врешті решт відбувається формування порочного кола «хронічна інфекція – хронічне

запалення», в якому не є можливим виділити первинний або провідний компонент [6, 33].

1.3 Мікробна етіологія прогресування хвороби

Площа поверхні дихальних шляхів становить приблизно 50–75 м². Верхні дихальні шляхи є вхідними воротами до внутрішнього середовища організму людини. Основними коменсалами нижніх дихальних шляхів є *Bacteroidetes* і *Firmicutes*, в меншій кількості – *Proteobacteria* і *Actinobacteria*. Методом геномного секвенування на основі 16s рРНК встановлено провідні таксони мікробіому у більшості здорових людей. Він включає роди *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Haemophilus* та *Neisseria*. Цікаво, що в такій добре аерованій ніші міститься значна кількість облигатних анаеробів, зокрема *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella* і *Porphyromonas* [36].

Відсутність або дисфункція ТРБМ суттєво впливає на реологію слизу особливо в дихальних шляхах. Обтурація дихальних шляхів в'язким слизом сприяє полімікробній проліферації та розвитку дисбіозу в дихальних шляхах. В респіраторних зразках хворих на МВ було ідентифіковано понад 1000 видів мікроорганізмів [6, 33, 36].

Вивчення бактеріального мікробіому хворих на МВ викликає труднощі через те, що класичне культуральне дослідження не може забезпечити вичерпне охоплення бактерій [36, 37]. *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* та *Proteobacteria* становлять >99% спільноти дихальних шляхів при МВ. Мікробіом нижніх дихальних шляхів демонструє надмірне представлення *Proteobacteria* та *Actinobacteria*. Родовий склад є наступним: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Atopobium* і *Porphyromonas* з варіаціями в таксонах. Різноманіття анаеробів при МВ менше, ніж в здорових дихальних шляхах і є важливим показником патофізіологічних процесів в легенях [36].

В численних дослідженнях показано, що хворі на МВ мають особливий мікробіом з переважаючим різноманіттям патогенів не типових для загальної

популяції. Склад респіраторного мікробіому розглядається як основний фактор захворюваності та смертності при МВ [4, 5, 6, 12, 14, 38]. Парадигма, що описує мікробний пейзаж дихальних шляхів при МВ, полягає в послідовній зміні провідних патогенів *S. aureus* та *H. influenzae* на *P. aeruginosa* та інші неферментуючі грамнегативні мікроорганізми – *B. cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* [36, 39, 40]. Останнім часом з'являється багато повідомлень про роль нетуберкульозних мікобактерій в патології дихальних шляхів при МВ та облигатних анаеробів.

Інфікування такими патогенами, зокрема *S. aureus*, відбувається ще в ранньому віці і сягає максимум в 11 – 17 років життя, коли інфікованими стають до 80% дитячої популяції. Зазвичай, *S. aureus* розглядається, як коменсал шкіри та слизових оболонок, проте в патогенезі МВ мікроорганізм має особливе значення. Ключовим фактором патогенності є лейкоцидин, пов'язаний з некротичними інфекціями. Підґрунтям для хронізації легеневої інфекції *S. aureus* є порушення його інтерналізації ТРБМ-дефіцитними макрофагами, зі сторони мікроорганізму – здатність до переходу на ферментативний тип існування [40]. МКФ мають змінену метаболічну активність, здатні уникати ефекторів імунної системи, механічного кліренсу та згубної дії протимікробних засобів [40, 41].

Фактором індукції селекції ауксотрофного фенотипу є гіпоксія, лікування антибіотиками (аміноглікозиди, сульфаніламід, фторхінолони) та ко-інфекція *P. aeruginosa* [42, 43, 44].

P. aeruginosa справляє вплив на *S. aureus* через продукцію сполуки 2-N-гептил-4-гідроксихінолону-N-оксиду та сидерофорів, тривала експозиція яких зумовлює появу ауксотрофії до менадіону та геміну. Натомість ауксотрофія до тимідину, зазвичай, пов'язана з тривалим лікуванням сульфаніламидами, які конкурентно інгібують фермент, відповідальний за утворення дигідрофолієвої кислоти [41, 42, 43]. Такі адаптивні властивості є способом уникнення згубної дії протимікробних засобів, серед яких особливо важливими є тобраміцин та триметоприм-сульфаметоксазол [40].

Варто зазначити, що більшість МКФ є нестабільними та здатні до зворотного перетворення в швидкозростаючий і небезпечний дикий тип [40, 41, 43]. Отримання та ідентифікація культури *S. aureus*, зазвичай не викликає труднощів, проте селекція ауксотрофного фенотипу потребує додаткових лабораторних заходів. Ауксотрофна модифікація, на ряду зі здатністю *S. aureus* до утворення біоплівки та набуття стійкості до метициліну та ванкоміцину, розглядаються, як основний фактор невдачі антибактеріальної терапії [41, 43].

Іншим прикладом міжмікробної взаємодії є *P. aeruginosa* та *S. aureus* є модифікація чутливості останнього до ванкоміцину. На моделі ТРБМ-дефіцитних миш показано, що екзопродукти *P. aeruginosa* знижують чутливість біоплівки *S. aureus* і планктонних популяцій до ванкоміцину [43].

P. aeruginosa є найбільш частим патогеном при МВ. Хронічна інфекція є прогностичним маркером і визначає прогноз для життя пацієнта. Зазвичай, лабораторна діагностика інфекції не викликає труднощів [14, 34, 37]. Для мікроорганізму характерним є формування мукоїдного фенотипу та МКФ [39, 45]. В мікросередовищі дихальних шляхів відбувається постійна боротьба за поживні речовини [46, 47]. В залежності від доступності поживних речовин, *P. aeruginosa* продукує ряд факторів вірулентності, зокрема ацил-гомосеринові лактони, алкіл-хінолони, рамноліпіди, феназини, сідерофори, які мають вплив на поведінку інших мікроорганізмів консорціуму, включаючи *A. fumigatus* [48, 49]. Деякі з наведених молекул, так звані, фактори кворуму, використовуються *P. aeruginosa* для міжклітинної комунікації з метою поліпшення стратегії виживання бактеріальної популяції. Стратегія виживання при МВ доповнюється переходом *P. aeruginosa* з немуконічного фенотипу в мукоїдний на стадії хронічної інфекції [39, 45, 50]. Таке перетворення також сприяє утворенню біоплівки, розширенню спектру факторів антимікотичної стійкості, резистентності до мукоциліарного кліренсу, ефекторів імунної системи господаря, з подальшою неможливістю абсолютної елімінації [39, 51]. Пояснення високим вірулентним властивостям бактерії полягає в великому геномі (до 6,3 млн основних пар) та існуванні значної кількості регуляторних генів [48].

Механізм «почуття кворуму» дозволяє *P. aeruginosa* утворювати складний комплекс з організованого консорціуму близько розташованих клітин та спільного для них позаклітинного середовища. Почуття кворуму – це різновид клітинних сигналів, відповідальних за експресію необхідних генів та ініціацію продукції факторів вірулентності [48, 51]. Таким чином, почуття кворуму є механізмом, необхідним *P. aeruginosa* для виживання. Важливими сигнальними молекулами, які сприймають кворум, у *P. aeruginosa* є ацил-гомосеринові лактони та алкіл-хінолони. До ацил-гомосеринових лактонів, перш за все, належить 3-оксо- C_{12} -гомосеринлактон та C_4 -гомосеринлактон. Серед алкіл-хінолонів особливе місце займають 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон, також відомий як *Pseudomonas*-хінолон, його прекурсор 2-гептил-4-хінолон та 2-гептил-4-гідроксихінолон-N-оксид [48, 52, 53].

У *P. aeruginosa* продукція факторів вірулентності та утворення біоплівки одночасно контролюється трьома системами сприйняття кворуму. В дослідженнях *Lee та ін.* повідомляється про ідентифікацію четвертої сигнальної молекули, яка сприймає кворум, 2-(2-гідроксифеніл)-тіазол-4-карбальдегід. Її синтез тісно контролюється *las* в умовах надлишку фосфатів [54]. Не виключено, що молекула є побічним продуктом синтезу піохеліну або його метаболітом [48].

Сигнальний *Pseudomonas*-хінолон активує каскад генів вірулентності, включаючи окисно-відновні феназини з відомою пригнічуючою активністю відносно грибів та бактерій [52, 53]. Сигнальний *Pseudomonas*-хінолон має високу спорідненість до трьохвалентного заліза (Fe^{3+}) та при зв'язуванні, зменшує його біодоступність в оточуючому середовищі. Додавання екзогенної молекули викликає експресію генів, відповідальних за продукцію сідерофорів – піовердіну та піохеліну [53, 54]. Тобто сполука може слугувати, як депо заліза та зберігати його в клітинній мембрані, а також транспортувати до бактеріальних клітин [48, 53, 54]. Зазначимо, що сигнальний *Pseudomonas*-хінолон відіграє подвійну роль відносно заліза в оточуючому середовищі: в умовах високого вмісту хімічного елементу може впливати на сідерофори *A. fumigatus* та забезпечувати гриби необхідним залізом, проте в умовах дефіциту – молекула є токсичною для грибів [48, 50, 55].

Сідерофори є низькомолекулярними хімічними речовинами зі здатністю до ефективного вишукування та хелатування заліза, і є специфічними для різних мікроорганізмів. Мікроорганізм *P. aeruginosa* продукує два сідерофори – піовердин та піохелін, які є необхідними для утворення біоплівки та виступають в якості факторів вірулентності [50, 54, 55]. Сідерофори *Pseudomonas* блокують утилізацію заліза мікроорганізмами, а сідерофори *Aspergillus* – бактеріями [48, 49]. При інфекції імунна система ссавців активно секвеструє залізо (використовуючи такі білки-хелатори, як гемоглобін, трансферин, лактоферин, ферритин) для обмеження його біодоступності, таким чином подавляючи ріст мікробів. Бактерії та гриби з використанням своїх сідерофорів протидіють такому обмеженню заліза в організмі хазяїна [48].

На прикладі ізолятів, отриманих з дихальних шляхів хворих на МВ, показано кореляцію між кількістю продукованого піовердину та якістю антифунгальної активності. В одному з досліджень продемонстровано, що сідерофор піовердин є ключовим фактором у *P. aeruginosa* для демонстрації антагоністичних властивостей в умовах дефіциту заліза. Навіть в умовах гіпоксії піовердин залишається основним медіатором антимікотичної активності, справляючи ефект, як на зрілу, так і на ще несформовану біоплівку *A. fumigatus*. Ефект піовердину *P. aeruginosa* призводить до залізного голодування у *A. fumigatus* та спонукає гриби до секреції власних сідерофорів. Тож, ключовими аспектами конкуренції між *P. aeruginosa* та *A. fumigatus* є кількість продукованих сідерофорів, їх спорідненість до заліза та, вірогідно, тривалість такої секреції [56].

Піохелін суттєво відрізняється від піовердину за своєю хімічною структурою [46, 48, 49]. Антимікотичні ефекти даного сідерофору пов'язані з обкраданням грибів не тільки залізом, але й цинком, адже піохелін має високу спорідненість до останнього. Іншим фактором є індукція оксидативного стресу через реактивні форми кисню та активні форми нітрогену [57, 58]. В той же час показано, що піохелін може виступати в якості екзогенного хелатора заліза для грибів в умовах дефіциту [48, 59].

Окрім сідерофорів, *P. aeruginosa* продукує ряд ферментів, токсинів та інших метаболітів, які суттєво підвищують патогенність мікроорганізму та його здатність до виживання в оточуючому середовищі [49, 53, 54, 55, 56]. Фермент еластаза В спричиняє деградацію імунних клітин, а також екстрацелюлярного матриксу. Біосинтез еластази В регулюється системами LasR і RhlR почуття кворуму та відбувається саме у мукоїдів. На прикладі ізолятів, отриманих від хворих на МВ, показано, що секреція еластази В суттєво підвищена в присутності *A. fumigatus*, тобто фермент відіграє важливу роль в обговорюваній мікробній взаємодії [48, 52].

Синтез рамноліпідів також опосередкований механізмом почуття кворуму. Рамноліпіди є поверхнево-активними молекулами, відповідальними за рухливість, відокремлення бактеріальних клітин від біоплівки тощо. Рамноліпіди вбудовуються в цитоплазматичну мембрану бактерій, справляючи антибактеріальну дію відносно широкого спектру грам-позитивних та грам-негативних мікроорганізмів. Сполуки справляють бактеріостатичний ефект на *A. fumigatus* через стовщення та модифікацію гіф з утворення коротких розгалужень на кінцях [48, 50, 53]. Дірамноліпіди тісно зв'язуються гіфами грибів через галактазаміноглікан екстрацелюлярного матриксу та стимулюють подальшу продукцію полісахариду та меланіну. В той же час, дірамноліпіди пригнічують β -1,3-глюкансинтазу на кінцях гіф, що спричиняє утворення нових верхівок з активною β -1,3-глюкансинтазою. Цей новий фермент далі знову пригнічується дірамноліпідами, що, врешті рещт, призводить до утворення багато розгалуженого фенотипу гіф з короткими апікальними клітинами. Дірамноліпіди також стимулюють синтез хітину у грибів, що слугує в якості компенсації β -1,3-глюкансинтази. Таким чином, рамноліпіди змінюють фенотип гіф та природу екзополісахаридного матриксу, який їх оточує [50, 57].

Феназини є групою нітроген-вмісних гетероциклічних сполук. Феназини виконують функцію пігментів, змінюють колір при зміні рН та під час окисно-відновних процесів. У *P. aeruginosa* тригером синтезу феназинів є каскад сигналів почуття кворуму, на який впливає щільність мікробної популяції, сигнали оточуючого середовища, внутрішньоклітинна фізіологія бактерій. Феназини

відіграють різноманітну роль в регуляції поведінки, розмноження, виживання, екологічної відповідності бактерії-продуцента. В залежності від сигналів оточуючого середовища, феназини змінюють патерни потоку внутрішньоклітинних електронів та баланс окисно-відновного стану бактерії. Вони також виконують важливу роль в утворенні бактеріальної біоплівки та змінюють архітектуру клітин [52, 59].

Мікроорганізм *P. aeruginosa* продукує різні деривати феназинів у відповідь на фактори зовнішнього середовища. У *P. aeruginosa* є чотири феназини – феназин-1-карбоксилова кислота, піюціанін, 1-гідрокси феназин та феназин-1-кабоксимід. Гени, які кодують білки шляху біосинтезу феназинів, знайдені в двох резервних оперонах з 7 генів. Ці оперони *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*pzn 1*) та *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phz2*) кодують два набори білків, які каталізують синтез феназин-1-карбоксилової кислоти, попередника для всіх інших дериватів. Конвертація феназин-1-карбоксилової кислоти в феназин-1-карбоксамід опосередковане ферментом PhzH, а в піюціанін – ферментами PhzM та PhzS. В планктонних культурах більшість трансформацій феназин-1-карбоксилової кислоти призводить до утворення піюціаніну. Проте в біоплівках – до феназин-1-карбоксаміду. Хоча й *pzh1* та *pzh2* оперони значного схожі (до 98% подібності), їх регуляція відбувається по різному: *pzh1* регулюється сигналами почуття кворуму, в той час як фактори відповідальні за експресію *pzh2* ще не ідентифіковані [52, 60].

Піюціанін, один з феназинів *P. aeruginosa*, знаходять в мокротинні хворих на МВ в концентрації до 135 мкМ [48]. Вважають, що високі концентрації піюціаніну спричиняють пошкодження легеневої тканини та у пацієнтів з МВ. Феназини *P. aeruginosa* мають фунгіцидний ефект на *A. fumigatus*. Молекули можуть проникати через клітинні мембрани та діють як відновники, викликаючи роз'єднання окисного фосфорилування та утворюючи токсичні внутрішньоклітинні активні форми кисню, шкідливі для гриба. Дослідження з використання мас-спектрометрії показало, що метаболіти бактеріальних феназинів пошкоджують власні молекули грибів в полімікробних консорціумах. Основний метаболіт феназину *P. aeruginosa*, феназин-1-карбоксилова кислота, після перетворення в 1-

гідроксифеназин далі трансформується в феназин-1-сульфат та 1-метоксифеназин. Ці метаболіти мають свої ефект на гриби: 1-гідроксифеназин та 1-метоксифеназин пригнічують ріст порівняно з феназин-1-карбоксиловою кислотою, а 1-гідроксифеназин також може стимулювати продукцію сидерофорів грибами. Зазначимо, що точна роль цих проміжних метаболітів ще не є визначеною. В одному з досліджень показано, що гриби *A. fumigatus* також здатні опосередковувати конвертацію феназин-1-гідроксилової кислоти в піоціанін з утворенням димерів. Таке біоперетворення може знижувати концентрацію піоціаніну, можливо через вплив на почуття кворуму і тому на продукцію факторів вірулентності *P. aeruginosa* [50, 61]. Автори *Briard та ін.* ідентифікували механізм впливу феназинів *P. aeruginosa* на архітектуру мітохондрій *A. fumigatus* та ріст гіф через індукцію оксидативного стресу. Автори показали, що високі концентрації феназинів, особливо піоціаніну та феназин-1-карбоксилової кислоти, можуть проникати в клітини грибів (конідії та гіфи) та порушувати продукцію мітохондріальної супероксид-дисмутази. Недостатність ферменту веде до підвищення продукції реактивних форм кисню та реактивних форм нітрогену в мітохондріях та подальшому виходу реактивних форм кисню в цитоплазму, що в кінцевому підсумку призводить до загибелі грибів. Автори повідомляють, що феназин-1-сульфат працює як хелатор заліза, який пригнічує гриби через обкрадання залізом [61]. Цікаво, що в деяких дослідженнях також повідомляли про можливі подвійні ефекти метаболітів феназинів на формування біоплівки грибів та їх розмноження. Автори *Zheng та ін.* повідомляли, що продукція бактеріальних феназинів здатна диференціально модулювати утворення біоплівок грибами *A. fumigatus*: низькі рівні реактивних форм кисню слугують сигналом для спороутворення, а високі рівні – є токсичними субстанціями. Тобто, розвиток *A. fumigatus* переключається з вегетативного до конідіації у відповідь на градієнт феназинів при культивуванні в змішаній культурі, та корелює з рівнем радикалів феназинів продукованих в феназин-індукованих окисно-відновних процесах [62].

B. ceracia complex включає ряд ідентифікованих видів, які називаються геномоварами: *Burkholderia ceracia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia*

cenocepacia, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrrocinia* та *Burkholderia pseudomultivorans*. Бактерія є надзвичайно стійкою до більшості протимікробних препаратів, в тому числі колістину, та здатна викликати спалахи серед хворих на МВ. Суворі заходи інфекційного контролю з сегрегацією пацієнтів використовуються для попередження поширення інфекції серед даної когорти хворих. Інфікування *B. ceracia complex* має несприятливий прогноз для життя, особливо видами *B. multivorans*, *B. cenocepacia* і *B. dolosa*), а позитивне дослідження на *B. cenocepacia* є критерієм виключення при трансплантації [36]. З використанням сучасних молекулярно-генетичних методів проводиться відстеження глобальної епідеміології *B. ceracia complex*. Високотрансмісивні штами *B. cenocepacia*, зокрема ST-28 і чеський штам ST-32, епідемічно поширені серед когорти з МВ у Канаді та Європі [63].

Головне питання, чому *B. cenocepacia* здатна колонізувати дихальні шляхи пацієнтів з МВ, залишається без відповіді. Відомо, що патоген також пов'язаний з імунodefіцитом при хронічній гранулематозній хворобі, проте при МВ відсутній подібний імунний дефект. Специфічний зв'язок між МВ та інфектом постульований лише для *P. aeruginosa*, що використовує дефектний ТРБМ для інтерналізації [39].

Іншим, не менш важливим питанням, є розуміння того, чому *B. cenocepacia* є агресивним патогеном, який в кінцевому підсумку призводить до смерті пацієнта. Відповідь криється у молекулярних механізмах регуляції вірулентності. Однією з причин є існування геномних острівців та мобільних елементів. За твердженням *Holden та ін.*, геномні острівці відіграють ключову роль в адаптації *B. cenocepacia* ST-28 до виживання в легенях при МВ і регуляції експресії значного пулу факторів вірулентності *B. cenocepacia* IIIA. Іншим фактором є існування системи кворуму, яка регулюється через експресію *N-ацил-гомосерин-лактон-синтази* і її відповідного регулятора. *B. cenocepacia* завжди продукує СерІ-синтазу з регулятором СерR [63]. Штами з геномним острівцем II продукують й інші сполуки чутливі до кворуму, зокрема синтазу CscII і регулятор CscR. Нещодавно був ідентифікований третій регулятор, СерR2, не пов'язаний з будь-якою суміжно

кодованою *N*-ацил-гомосерин-лактон-синтазою. Ідентифіковано ряд генів, які регулюються почуттям кворуму, і є відповідальними за продукцію сидерофорів, синтез протеаз, системи секреції III типу, рухливість та утворення біоплівки [64].

Боротьба за позаклітинне залізо є важливою адаптивною властивістю мікроорганізмів. В умовах дефіциту заліза *B. ceposerasia* продукує два основних сидерофори – орнібактін та піохелін, які визбирюють вільне залізо з позаклітинного середовища. Орнібактін є основним сидерофором і здатний компенсувати функцію піохеліну. Деякі штамів *B. ceposerasia*, зокрема J2315, мають порушену продукцію піохеліну через мутацію в гені *pchF*, відповідального за біосинтез даного сидерофору. Цікаво, що при інкубації *B. ceposerasia* J2315 в середовищі з MB-мокротинням відбувається активація генів відповідальних за біосинтез піохеліну (*pchR* та *pchD*), але не орнібактіну. Такі дані свідчать про можливість функціонування шляхів біосинтезу піохеліну у *B. ceposerasia* J2315 в умовах багатого на залізо середовища, яким і є мокротиння при MB, навіть за умов дефекту *pchF* [65].

Одним з основних компонентів зовнішньої мембрани бактерій роду *Burkholderia* є ліпополісахарид. У деяких штамів *B. ceposerasia* також може спостерігатися експресія капсульного екзополісахариду, який надає бактеріальним колоніям мукоїдного вигляду. Продукція екзополісахариду відіграє важливу роль у хронізації інфекцій *B. serasia complex* [63]. Усі гени відповідальні за продукцію ліпополісахариду локалізовані на хромосомі 1 і представлені трьома основними кластерами – ліпід А (BCAL 1929–BCAL 1935), ядро (BCAL 2402–BCAL 2408) та антиген О (BCAL 3110–BCAL-3125) [65]. Окрім того, на цьому репліконі розташовані також додаткові гени модифікації цукрів – *hldD/hldA* (BCAL 2944/BCAL 2945) та *rmlD* (BCAL 3132) [63].

Деякі штами *B. ceposerasia* не експресують О-антиген, зокрема J2315. Штам *B. ceposerasia* K56-2 має повний кластер генів для біосинтезу антигену О та експресує антиген О; інактивація цього шляху мутацією призводить до появи атенуйованого фенотипу. Мутанти за О-антигеном фагоцитуються макрофагами

значно швидше, ніж батьківський штам, однак це не впливає на їх внутрішньоклітинне виживання [67].

B. ceposerasia має природну стійкість до поліміксинів, аміноглікозидів та більшості β -лактамів. Мікроорганізм може розвивати резистентність практично до всіх класів антимікробних препаратів *in vivo*. Мікроорганізм продукує β -лактамази, ферменти інактивації аміноглікозидів, дигідрофолат-редуктазу. Інші механізми резистентності полягають у модифікації мішені, зміні проникності клітинної стінки та активації ефлюксних насосів. Геном *B. ceposerasia* J2315 містить кодувальні послідовності для всіх п'яти основних сімейств ефлюксних систем, причому сімейство резистентності-нодуляції-поділу є найбільш активним насосом [68].

Встановлено, що в мокротинні пацієнтів з МВ у *B. ceposerasia* відбувається активація генів відповідальних за експресію джгутиків. Такі дані різняться від свідчень описаних відносно *P. aeruginosa* – в дихальних шляхах хворих з хронічною інфекцією мікроорганізм набуває нерухомого фенотипу. Збережена рухливість у *B. ceposerasia* може бути пояснена регуляцією транскрипції генів джгутиків почуттям кворуму. Окрім джгутиків, штами *B. ceposerasia* також експресують фімбрії необхідні для інвазії в респіраторний епітелій. До інших факторів патогенності мікроорганізмів роду *Burkholderia* належать цинкові металопротеїнази, фосфоліпаза С [63, 65, 67].

Тестування на кислото-стійкі бактерії є важливим аспектом мікробіологічного моніторингу. Найчастіше в біологічному матеріалі від хворих на МВ знаходять саме *Mycobacterium abscessus* та *Mycobacterium avium* [69, 70, 71].

Роль грибів в патогенезі МВ залишається відкритою. *Aspergillus spp.* часто виділяють від хворих на МВ, при чому 67–73% позитивних культур припадає на *A. fumigatus*. Інші види, зокрема *A. flavus*, *Aspergillus niger* і *Aspergillus terreus* зустрічаються у 2-4% випадків. Слід зазначити, що поширеність *Aspergillus spp.* в зразках мокротиння пацієнтів з МВ збільшується з віком, досягаючи 46%-78% у дорослих. Тестування на гриби роду *Aspergillus*, окрім культурального дослідження, має включати ПЛР та визначення рівня галактоманнану (компонента клітинної стінки *Aspergillus*) в мокротинні, а також загального IgE, специфічних IgE

та IgG проти *A. fumigatus* в сироватці крові. Розвиток хронічного бронхолегеневого аспергільозу є негативною прогностично значущою ознакою [28].

Scedosporium apiospermium complex включає три види, патогенні для людини: *Scedosporium apiospermium sensu strictu*, *Scedosporium boydii* та *Scedosporium aurantiacum*. Вони є другими за поширеністю нитчастими грибами, виділеними з дихальних шляхів пацієнтів з МВ. Поширеність даного роду грибів в зразках з дихальних шляхів хворих на МВ становить від 0,7% до 9%. Клінічне значення присутності *S. apiospermium complex* в дихальних шляхах залишається предметом дискусій. У більшості випадків контакт із організмом людини призводить до безсимптомної тимчасової або постійної колонізації. Інфікування дихальних шляхів *Scedosporium apiospermium complex* частіше зустрічається в підлітковому і дорослому і пізніше, ніж колонізація *Aspergillus spp.* [5, 36].

Поширеність виділення дріжджових грибів роду *Candida* в зразках з дихальних шляхів дорослих хворих на МВ сягає 93%. Тривала протимікробна терапія є одним із головних факторів, пов'язаних із колонізацією *Candida spp.* *Candida albicans* є найчастішим видом, який виділяють від пацієнтів з МВ, хоча також повідомлялося про *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* та *Candida tropicalis*. Деякі автори припускають, що колонізація дихальних шляхів грибами роду *Candida* може бути пов'язана з довгостроковим зниженням об'єму форсованого видиху за 1-у секунду (ОФВ1) [36, 37, 38].

1.4 Фактори, що зумовлюють становлення хронічної інфекції при муковісцидозі

Основними факторами, що сприяють хронічній колонізації дихальних шляхів при МВ є формування біоплівки та поява мутантних морфотипів, стійкість до антибіотиків основних патобіонтів та ефективна трансмісія резистентних клонів між пацієнтами [73].

Сучасна практика лікування МВ включає використання широкого спектру протимікробних засобів [71, 72, 73]. З одного боку, така стратегія суттєво збільшила тривалість та якість життя пацієнтів, проте з іншого призводить до селекції клонів з лікарською стійкістю [20, 73]. MRSA, мультирезистентні штами *P. aeruginosa* та

інших НФГНМО особливо викликають занепокоєння. В дитячому віці інфекція *P. aeruginosa* є перехідною і, зазвичай, в інфекційний процес залучені кілька клонів з різним профілем чутливості до антибіотиків. Але, врешті-решт, у віці до 25 років понад 70% пацієнтів із МВ набувають хронічної інфекції з одним домінантним добре адаптованим клоном. Мікроорганізм *P. aeruginosa* та інші НФГНМО мають природну стійкість до широкого ряду антибіотиків і здатні розвивати подальшу резистентність, тому такий домінантний штам є добре адаптованим і має широкий профіль лікарської стійкості [5, 20, 73].

Біоплівки є організованими мікробними консорціумами, оточені позаклітинним полімерним матриксом. Така форма існування мікробної популяції робить її недосяжною до механічного та імунного кліренсу, а також дії протимікробних засобів. Фактично, перехід від планктонного до біоплівкового способу росту в даний час визнається одним з найбільш важливих чинників хронічних інфекцій, тому відіграє важливу роль в патогенезі МВ. Крім того, патогенні властивості біоплівок пов'язані зі складнощами діагностичними та лікування [73, 74]. Архітектура біоплівок складна і в значній мірі залежить від доступності поживних речовин і кисню. Формування біоплівки включає три етапи: прикріплення, дозрівання та розсіювання [74, 75]. Розвиток біоплівки починається з прилипання планктонних бактерій до поверхні за допомогою пілей та джгутиків у грам-негативних бактерій або поверхневих білків у грам-позитивних. Ї хоча, зазвичай, біоплівкову модель описують за рахунок прикріплення до твердої поверхні (біотичної чи абіотичної), при МВ показано, що біоплівка утворюється безпосередньо на слизу і не завжди контактує з епітелієм легень [73, 76].

Після адгезії відбувається розмноження бактерій з формуванням мікроколоній та продукція полімерного матриксу. Останній відіграє важливу роль у розвитку біоплівки не тільки, як захисний бар'єр проти захисту господаря, антибіотиків, висихання або активних форм кисню (АФК), але й також, забезпечуює когезію структури та діє як джерело поживних речовин [73]. Тобто, для мікробного світу матрикс є фізіологічний бар'єром, який складається з конгломерату

екзополісахаридів, позаклітинної ДНК (еДНК), поверхнево-активних речовин, ліпідів, продуктів мікробного лізису та сполук організму-хазяїна [73, 75, 77].

У прикріпленні, утворенні та стабільності мікроархітектури біоплівки *P. aeruginosa* відіграють роль три екзополісахариди – Psl, Pel та альгінат. Psl є нейтральним пентасхаридом, що містить d-глюкозу, d-маннозу та r-рамнозу. Psl необхідний для адгезії до поверхні та міжклітинної комунікації при ініціації біоплівки немукоеїдних і мукоеїдних штамів. У зрілій біоплівці Psl розташований на периферії біоплівки та забезпечує стабільність її мікроархітектоніки. Надлишкова експресія Psl пов'язана з утворенням клітинних агрегатів у рідкому середовищі та спостерігається в мокротинні пацієнтів з МВ. Psl функціонує як сигнальна молекула для синтезу біс-(3'-5')-циклічного димерного гуанозинмонофосфату, високі рівні якого призводять до появи щільніших та міцніших біоплівок. Крім того, Psl захищає бактерії біоплівки від антимікробних препаратів та фагоцитозу, що робить його ефективним захистом для досягнення стійкої інфекції. Pel є катіонним полісахаридним полімером частково деацетильованого N-ацетил-d-глюкозаміну та N-ацетил-d-галактозаміну. Як і Psl, Pel є важливим матриксним компонентом біоплівки немукоеїдних штамів і приймає участь в ініціації адгезії та підтримці цілісності біоплівки. Pel відповідає за формування плівки, яка утворюється на межі повітря-рідини в статичній бульйонній культурі. Синтез Psl і Pel є штам-специфічним і може змінюватися в залежності від умов оточуючого середовища. Pel забезпечує стійкість до аміноглікозидів, колістину та уникнення факторів імунного кліренсу [74]. Альгінат переважно утворюється в біоплівці мукоеїдних штамів *Pseudomonas* через мутацію в алелі *tucA*. Мукоеїдні фенотипи зустрічаються переважно серед ізолятів від пацієнтів з МВ та свідчать про перетворення гострої інфекції в хронічну. Альгінат – це негативно заряджений ацетильований полімер, що складається із залишків мануронової та гулууронової кислот. Альгінат є основним екзополісахаридом біоплівки *Pseudomonas* і забезпечує її дозрівання, захист мікробних клітин від фагоцитозу та опсонізації, а також зниження дифузії антибіотиків. Співвідношення між залишками кислот впливають на в'язкопружні

властивості біоплівки та проявляються у погіршенні механічного кліренсу в легенях пацієнтів з МВ, інфікованих *P. aeruginosa* [74, 76].

У полісахарид-залежних біоплівках *S. aureus* основним компонентом екзополісахаридного матриксу є полі- β -(1-6)-N-ацетилглюкозамін, який називають полісахаридним міжклітинним адгезином (ПМА). Виробництво ПМА залежить від оперону внутрішньоклітинної адгезії *ica*. Оперон *ica* складається з чотирьох генів, розташованих у такому порядку: *icaA*, *icaD*, *icaB* та *icaC* [78]. Полімер ПМА відіграє важливу роль в забезпеченні структурної цілісності біоплівки *in vitro* та *in vivo*, проте в численних дослідженнях було виявлено штами *S. aureus*, здатні утворювати *ica*-незалежні біоплівки [78, 79]. Окрім полісахарид-залежних біоплівок, також було показано, що *Staphylococcus* утворюють біоплівки, матрикс яких в основному складається з білкового матеріалу. Такі біоплівки описані у MRSA. Третій тип біоплівки *Staphylococcus* є еДНК-залежним. Перші дослідження цього типу біоплівки пов'язані з вивченням мутантів з дефіцитом *AtlA*, основного аутолізину *S. aureus*, відповідального за вивільнення еДНК. Такі мутанти демонструють знижену здатність до утворення біоплівки в експериментах *in vitro*, тоді як мутація в генах відповідальних за експресію стафілококової термонуклеази призводить до збільшення утворення біоплівки. Нарешті, зрілі біоплівки *Staphylococcus* чутливі до доданої зовні ДНКази I, демонструють, що еДНК є структурним компонентом матриці біоплівки [78].

Кінцевою стадією утворення біоплівки є вивільнення пулу бактерій з матриксу біоплівки, тобто дисперсія [74-79]. Бактеріальна популяція може повертатися до планктонної фази у відповідь на біологічні сигнали, зокрема обмеження поживних речовин. Цей заплутаний процес регулюється внутрішньо- та позаклітинними сигналами, які модулюють рівні дифузійних сигнальних молекул, вторинних месенджерів та малих РНК [73]. Почуття кворуму виявляє ці сигнали і запускає зміни в транскрипції бактеріальних генів, включаючи фактори вірулентності та різноманітні білки, які беруть участь у природній стійкості біоплівок до антибіотиків та ефекторів імунної системи. Біоплівки *P. aeruginosa* здатні самостійно ініціювати відшарування; цей процес може бути опосередкований

надмірною експресією альгінат-ліази або посиленням таких факторів рухливості, як рамноліпіди і пілі IV типу секреції [76].

Біоплівки можуть протистояти концентрації антибіотиків в 100–1000 разів вищій, ніж планктонні клітини [73]. Матриця біоплівки діє як первинний бар'єр та запобігає проникненню антибіотиків. Деякі компоненти матриці, такі як альгінат і еДНК, виявляють антибіотик-хелатну активність [74, 76, 78]. Крім того, еДНК зумовлює толерантність до аміноглікозидів [73, 74]. Шари слизу в легенях при МВ створюють анаеробні умови, тому біоплівки мають тенденцію збільшувати виробництво альгінату, що є додатковим фактором толерантності до аміноглікозидів. Реакція на осмотичний стрес може сприяти резистентності до антибіотиків, викликаючи зміну пропорцій поринів [74, 75, 76].

Персистери визначають як сплячий фенотипічний стан бактерій у біоплівках, що характеризується високою толерантністю до антибіотиків. Персистери є джерелом відновлення мікробної популяції після лікування [73, 74].

На додаток до природної стійкості, чутливість до антибіотиків може бути значно погіршена внаслідок набуття певних хромосомних мутацій. Це особливо актуально для основного збудника при МВ, *P. aeruginosa*, враховуючи його надзвичайну здатність набувати резистентності через мутації зі зміною експресії механізмів резистентності, кодованих на хромосомі. Постійне надбання нових мутацій відносно різних груп антибіотиків в кінцевому результаті проявляються в надмірній експресії ефлюксних насосів, гіперпродукції хромосомної цефалоспориноми *AmpC*, втраті поринів та модифікації таргетних сполук.

Мікроорганізми *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* та *B. ceracia complex* виділяють від пацієнтів з МВ в менше, ніж 10% випадків, проте їх присутність пов'язана з поганим клінічним прогнозом. НФГНМО мають високу природну стійкість до багатьох протимікробних засобів. *B. ceracia complex* є незвичним патогеном, який, зазвичай, можна виділити з середовища – вода, земля тощо. Лише серед пацієнтів з МВ *B. ceracia complex* є збудником хронічного гранулематозного захворювання з поганим клінічним прогнозом та високою трансмісією між хворими. *B. ceracia complex* мають природну стійкість до β -лактамів (в т. ч. тікарциліну, піперациліну),

хлорамфеніколу, хінолонів, цефалоспоринів I та II поколінь, триметоприму, поліміксинів, аміноглікозидів [80].

1.5 Роль факторів вродженого імунного захисту в патогенезі муковісцидозу

Сучасна патофізіологічна концепція ураження легень при МВ полягає в надмірній імунній відповіді організму з розвитком хронічного місцевого та системного запалення з супутньою мікробною колонізацією. Проте існують докази того, що запальний процес в дихальних шляхах може розвиватися задовго до набуття хронічної інфекції та є фактором, що вказує на додатково наслідувану модуляцію вродженого імунітету [81, 82]. З одного боку порушення розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних патернів (ПАМП), аномальна секреція хемокінів та цитокінів і дефектний механічний кліренс створюють передумови для мікробної колонізації [33]. Проте з іншого – активне накопичення нейтрофілів в дихальних шляхах потенційно мало б забезпечувати ефективний імунний кліренс. В той же час процес злиття фагосоми з лізосомою під час фагоцитозу є неефективним в ТРБМ-дефіцитних макрофагах, тому ефективний процесинг антигену не відбувається [40]. Такі особливості мікросередовища дихальних шляхів призводять до формування порочного кола «хронічна інфекція ↔ хронічне запалення» з постійним конститутивним пошкодженням тканини легень великою кількістю цитокінів, ферментів (протеаза та еластаза), оксидантів та неефективності механічного та імунного кліренсу [33, 37].

АМП є катіонними ендогенними білками, які експресуються епітеліальними клітинами та нейтрофілами. Їх активність залежить від концентрації солей в мікросередовищі середовищі і, доведено, є меншою при МВ. АМП є важливим компонентом неспецифічного захисту дихальних шляхів, які приймають участь в безпосередній інактивації патогена, проте також володіють рядом системних ефектів, зокрема в регуляції запалення [80, 81]. Людські β -дефензини та кателіцидин є двома основними сімействами протимікробних пептидів, які експресуються

епітеліальними клітинами тіла людини. Вони включають людські β -дефензини 1-4 (hBD-1-4) та єдиний людський кателіцидин LL-37/hCAP-18 [83].

Цитокіни β -дефензини секретуються альвеоцитами легень та імунними клітинами – нейтрофілами, моноцитами/ макрофагами, лімфоцитами, натуральним кілерами, клітинами Панета. Людський hBD-2 є індукцибельним пептидом з відомою активністю проти грам-позитивних та грам-негативних патогенів, зокрема грибів, *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* [7, 82-85]. Людські дефензини регулюють активність широкого спектру імунних клітин, включаючи моноцити/ макрофаги, дендритні клітини, Т-клітини пам'яті та тучні клітини. Встановлено, що hBD-2-4 здатні стимулювати експресію інтерлейкіну-6 (IL-6), IL-10, інтерферону- γ (IFN- γ), макрофагального запального білка-3 α (МЗБ-3 α) та RANTES/CCL5. Дефензини hBD-2 і hBD-3 стимулюють моноклеарні та поліморфноядерні клітини до продукції фактору некрозу пухлин- α (TNF- α), IL-10 та IL-6 у вогнищі запалення. Крім того, ці цитокіни стимулюють імунні клітини до експресії більшої кількості АМП [87].

Поряд з дефензинами синергійним антибактеріальним ефектом володіє й інший АМП – кателіцидин hCAP-18/LL-37, який розглядають як один з ключових молекулярних компонентів вроджених механізмів імунітету, що забезпечують невідкладний захист від інфекцій на рівні фізіологічного бар'єру – слизових оболонок і шкіри [82, 83, 86]. Цей пептид виконує важливу функцію в початковому захисті господаря від патогенів та може бути виявлений на ділянках взаємодії господар – мікроб, включаючи легені, кишечник, шкіру, а також при пошкодженні тканини. Кателіцидин проявляє антимікробну активність широкого спектра дії проти як грам-позитивних, так і грам-негативних мікроорганізмів, а в деяких випадках і вірусів [83]. hCAP-18/LL-37 експресується, як пре-про-пептид. Пропептид hCAP-18 є нефункціональним та зберігається в нейтрофілах і секреторних гранулах макрофагів. Після секреції про-частинка відщеплюється і вивільняється С-термінальний пептид LL-37 з широким спектром активності [82, 83, 84]. LL-37 є єдиним представником кателіцидів, який ідентифікований у людей.

LL-37 конститутивно експресується нейтрофілами, тучними клітинами, натуральними кілерами та епітеліальними клітинами. LL-37 також сприяє міграції

мононуклеарів/ макрофагів у вогнище запалення і стимулює фагоцитоз грам-позитивних і грам-негативних бактерій макрофагами [87]. Продемонстровано активність даного АМП відносно *S. aureus* (в тому числі MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* групи A, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* та *Prevotella intermedia*. Також було показано проєктивну роль LL-37 відносно утворення біоплівки та активність щодо оболонкових та простих вірусів [82]. Серед імунних ефектів важлива значення має індукція хемотаксису, дегрануляції та накопичення клітин у вогнищі запалення. Згадані ефекти зокрема стосуються макрофагів, нейтрофілів та тучних клітин [83]. Вплив на тучні клітини відбувається через рецептор MrgX2 на їх поверхні. LL-37 індукує активацію каспази-1, процесинг і вивільнення IL-1 β через зв'язування з рецептором P2X7 активованих макрофагів, і сприяє виробленню АМП нейтрофілами [87].

LL-37 володіє прозапальною дією, стимулюючи імунні клітини до секреції хемокинів і прозапальних цитокінів. Він безпосередньо стимулює тучні клітини синтезувати IL-1 β , IL-6, TNF і хемокини, включаючи CCL2 і CCL3, а також викликає посилення експресії TLR2, TLR4 і TLR9 на поверхні тучних клітин і TLR3, TLR5 і TLR7 – в цитоплазмі. Крім того, LL-37 сприяє експресії хемокинів – CXCL8/IL-8, моноцитарних хемоаттрактантних білків-1 і 3, а також індукує хемотаксис, проліферацію та диференціацію моноцитів [87].

Механізм кілінгу бактерій забезпечується шляхом зв'язування позитивного заряду АМП до негативно заряджених компонентів на поверхні бактерій, таких як ліпополісахарид грам-негативних бактерій або ліпотьхоева кислота грампозитивних мікроорганізмів. Надалі відбувається руйнування зовнішньої бактеріальної мембрани, з подальшою більш повільною пермеабілізацією внутрішньої мембрани. Пермеабілізація внутрішньої мембрани бактерій АМП включає взаємодію як з фосфоліпідними групами, так і з гідрофобними ділянками всередині внутрішньої мембрани [83, 84, 87]. В ряді досліджень також було показано антибіоплівкову активність АМП. Додавання наномолярних концентрацій hBD-2 до *P. aeruginosa* (ізолят від пацієнта з МВ), *Acinetobacter baumannii* та інших НФГНМО значно зменшує ефективність утворення біоплівки за рахунок зміни топології її

поверхні, але без пошкодження внутрішніх метаболічних процесів. Експресія генів, пов'язаних з біоплівкою і позаклітинне накопичення піорубіну не відрізнялися суттєво між дослідом і контролем, а моделювання *in silico* не показало прямого зв'язування hBD-2 з молекулами, що сприймають кворум. Однак дефекти білкового профілю зовнішньої мембрани, які спостерігалися після обробки культури hBD-2, задокументовані за допомогою атомно-силової мікроскопії. Це свідчить про те, що hBD-2 індукує зміни ультраструктуру біоплівки, які перешкоджають потрапляння прекурсорів в позаклітинний простір. Аналогічні дослідження показані відносно грам-позитивних мікроорганізмів, але ефект наступав при використанні макромольярних концентрацій [84].

АМП часто виявляють кращу біологічну активність в комбінації з іншими АМП або антибіотиками. Показано, що використання коктейлю протимікробних засобів *in vitro* може дозволити зменшити дозу кожного окремого препарату, а отже, знизити ризик розвитку резистентності. LL-37 та людський дефензин α -1 (HNP-1) мають синергічні властивості та разом проявляють значно більшу протимікробну активність. Ефективність антибіотиків так можна потенціювати за допомогою комбінації з АМП – LL-37 підсилює бактерицидну дію колістину та іміпенему, в тому числі мультирезистентних штамів *P. aeruginosa*.

Роль протимікробних пептидів в патогенезі МВ широко обговорюється, проте все ще залишається відкритою [82, 83]. Згідно з однією з теорій, зниження активності протимікробних пептидів в дихальних шляхах пов'язане з високою концентрацією солей в респіраторному секреті [88]. Проте інші автори повідомляли й про сіль-незалежну активність дефензинів та кателіцидину [83, 89]. Також було показано, що α -дефензини та LL-37 мають прямий цитотоксичний вплив на епітеліальні клітини [90]. Іншим прикладом вірогідно негативного впливу кателіцидину є стимуляція росту грибів роду *Aspergillus spp. in vitro*, проте, в даному випадку, не можна виключати факт адаптації мікроорганізму до агресивних умов середовища та продукцію факторів вірулентності (зокрема, гліотоксину) у відповідь на стрес [86]. Бактерицидна дія LL-37 показана в дослідженнях без використання клітинних культур може різнитися від ефектів *in vivo*. Показано, що при культивуванні

P. aeruginosa в лінії епітеліальних клітин бронхів, отриманої від пацієнта з МВ, ефективність мікробіцидної дії пептиду помітно зменшується. Й хоча механізми таких змін все ще досліджуються, припускають, що причиною може бути деградація LL-37 протеазою бронхіальних епітеліальних клітин після інфікування *P. aeruginosa* [82]. Аналогічним прикладом взаємодії хазяїн-мікроб є деградація LL-37 аспарагіновими протеазами (SAP) *Candida albicans*. LL-37 розщеплюється на кілька продуктів за допомогою SAP-1-4, SAP-8 і SAP-9. Цей протеолітичний процес корелює з поступовим зниженням антимікотичної активності LL-37. Основний проміжний продукт розщеплення, пептид LL-25, все ще наділений антифунгальними властивостями, проте позбавлений імуномодуючих. Стимуляція пулу нейтрофілів LL-25 є менш ефективною, ніж LL-37, що призводить до зниження хемотаксичної активності пептиду та зумовлює недостатнє накопичення імунних клітин у вогнищі інфекції. LL-25 також втрачає функцію інгібітора апоптозу нейтрофілів, що зумовлює скорочення тривалості життя цих ефektorів імунної системи. Показано, що використання аспарагінових протеаз *C. albicans* є адаптивним фактором, що дозволяє патогену виживати та розмножуватися [91].

Було показано, що АПМ можуть сприяти загоєнню ран після пошкодження шкіри через регуляцію комплексної взаємодії кератиноцитів, фібробластів, ендотеліальних клітин, імунних клітин та позаклітинного матриксу. Окрім того АМП мають потенціал при лікуванні багатьох захворювань шкіри, зокрема меланоми, акне, діабетичної виразки стопи та псоріазу. Експериментальні дослідження показали, що LL-37 і білок S100 в келоїдних тканинах зменшують вироблення колагену [82]. З іншого боку, АМП пов'язані з виникненням і розвитком діабету. У пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу виявлено, що рівень LL-37 у сироватці позитивно корелює з маркерами запалення та негативно корелює з рівнем ліпопротеїнів високої щільності. Окрім того, було показано, що поліморфізм генів, що кодують дефензини пов'язаний з підвищеною чутливістю до грибів роду *Candida* у пацієнтів з цукровим діабетом I типу та хронічним обструктивним захворюванням легень [83]. В той же час, під впливом коротко-ланцюгових жирних кислот

продукованих мікроорганізмами кишечника, кателіцидин-споріднений антимікробний пептид, що виробляється β -клітинами підшлункової залози, індукує активацію регуляторних імунних клітин і тим самим знижує захворюваність на аутоімунний діабет [87].

АМП приймають участь в регуляції запалення при системних інфекціях. Продemonстровано, що введення екзогенного LL-37 пов'язане з покращенням виживання лабораторних миш з експериментальною моделлю полімікробного сепсису. Механізм такої позитивної дії полягав в нейтралізації ліпополісахариду та пригніченні АТФ-індукованого/P2X7-опосередкованого піроптозу макрофагів, каспаза-1-опосередкованої клітинної смерті та продукції прозапальних цитокінів. Ще одним ефектом АМП є підтримка гомеостазу товстого кишечника, відновлення тканин і запобігання раку через контроль еубіозу [83, 87].

В педіатричних клінічних дослідженнях показано, що зміна кишкової експресії hBD-2 пов'язана з некротичним ентероколітом, запальними захворюваннями кишечника та дебютом алергічних захворювань. Високі концентрації hBD-2 в фекаліях відображали сильну імунну відповідь у кишечнику та були пов'язані з середньо-важким перебігом некротичного ентероколіту у передчасно народжених дітей. При тяжкому перебігу низька експресія hBD-2 супроводжувалася низькою експресією TLR4/MD2 та вказувала на неадекватну реакцію на бактерії кишечника. В ряді досліджень серед дітей молодшого шкільного віку показано, що для неспецифічного виразкового коліту та хвороби Крона характерним є надмірна експресія hBD-2 в кишечнику. В клінічному дослідженні серед дітей віком від 0 до 6 місяців показано, що висока продукція hBD-2 в кишечнику є фактором ризику алергічної сенсibiliзації у віці до 5 років, в іншому дослідженні – до 2 років [92]. У дорослих з цукровим діабетом 2 типу концентрації hBD-2 та LL-37 в сироватці крові та слині позитивно корелювали зі ступенем тяжкості хронічного періодонтиту та рівнем глюкози крові [93].

Наведені асоціації підтверджують роль протимікробних пептидів в регуляції вродженої імунної відповіді та запалення. Імунні ефекти АМП підсумовані в рис.

1.2. Засновуючись на їх захисних прозапальних властивостях, можна очікувати, що АМП відіграють одну з ключових ролей в патогенезі захворювання легень при МВ.

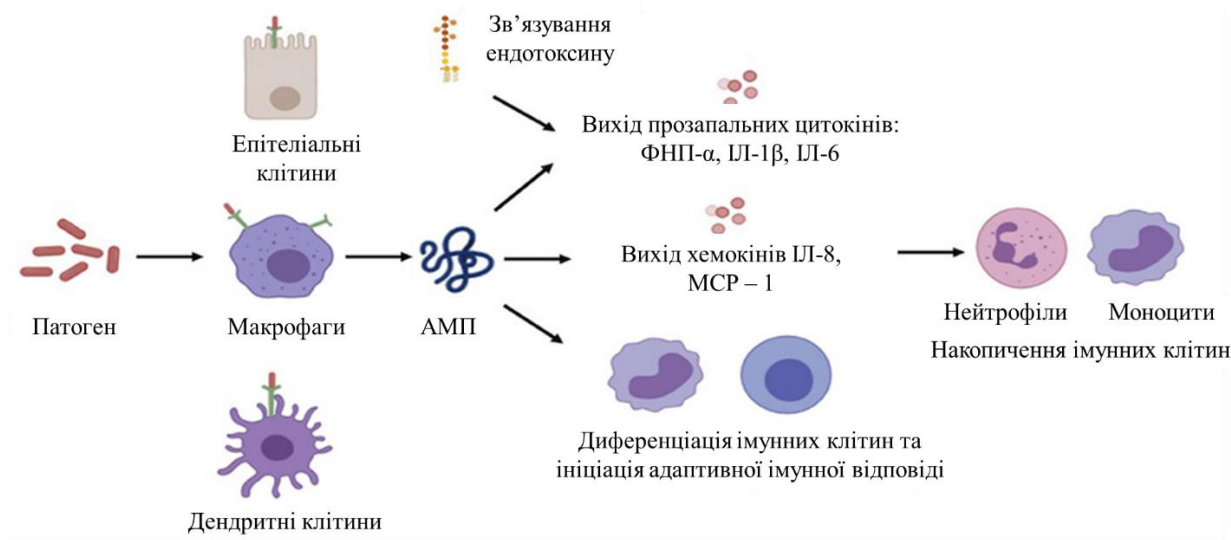


Рис. 1.2 Схематичне зображення імунорегуляторних ефектів антимікробних пептидів [адаптовано з 82].

Примітка: АМП – антимікробні пептиди; ІЛ – інтерлейкін; MCP – хемоаттрактантний білок моноцитів; TNF-α – фактор некрозу пухлини альфа.

Очевидно припустити, що фізіологічна концентрація АМП різниться в залежності від локусу організму людини та віку. Для оцінки концентрації hBD-2 і hCAP-18/LL-37 у мокротинні дітей відсутні референсні значення [94, 95]. Літературні дані щодо вмісту АМП у БАЛ, слині та орофарингеальному секреті дихальних шляхів представлені в табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Концентрація hBD-2 та hCAP-18/LL-37 в секретах дотичних до дихальних шляхів

Біологічна рідина	Стан здоров'я	hBD-2	hCAP-18/LL-37
БАЛ			
<i>Christiane I.-U. Chen та ін. (2003)</i>	МВ	0-7 мкг/мл	0-15 мкг/мл

Продовження табл. 1.2

<i>Hiratsuka</i> та ін. (2003)	Дифузний панбронхіоліт Здорові	71,5 (28,7) пг/мл; 0,3 (0,2) пг/мл	-
<i>Ross</i> та ін. (2004)	Облітеруючий панбронхіоліт Здорові	1270 (430) пг/мл; 204 (180) пг/мл;	-
<i>Xiao</i> та ін. (2005)	МВ Здорові	-	189,7 (18,7) нг/мл 120,7 (24,7) нг/мл
<i>Ghosh</i> та ін. (2007)	Здорові	0,04 (0 – 0,049) мкг/г;	0,04 (0 – 0,049) мкг/г
<i>Cakir</i> та ін. (2014)	Туберкульоз легень Здорові	0,14 (0,30) нг/мл 0,30 (0,58) нг/мл;	0,35 (0,51) нг/мл 0,95 (1,33) нг/мл;
Орофарингеальний секрет			
<i>Vilenskyi</i> та ін. (2021)	Бронхіальна астма Здорові	195 (190;197) нг/мл 251 (248; 253) нг/мл;	0,43 (0,41; 0,46) пг/мл 0,89 (0,83; 0,92) пг/мл;
Слина			
<i>Ghosh</i> та ін. (2007)	Здорові	9,5 (1,2 – 21) мкг/л;	-

Christiane I.-U. Chen та ін. (2003) досліджували вміст hBD-2 та LL-37 у БАЛ людей із МВ (5–34 роки). У дослідженні зі збільшенням щільності клітинної інфільтрації та відносної кількості нейтрофілів концентрація hCAP-18/LL-37 зростала. Наявність *P. aeruginosa* не була пов'язана зі значним підвищенням рівня

АМП у досліджуваній популяції. Концентрація hBD-2 і hCAP-18/LL-37 описана в межах від 0 до 7 мкг/мл і від 0 до 15 мкг/мл відповідно. Концентрація АМП у мокротинні дітей із МВ була значно нижчою, ніж у БАЛ дорослих із хронічною легеневою інфекцією [96].

Xiao W. та ін. (2005) встановили, що концентрація hCAP-18/LL-37 у БАЛ пацієнтів з МВ становить 189,7 (18,7) нг/мл і є значно вищою, ніж у здорових осіб – 120,7 (24,7) нг/мл ($p = 0,036$). Вони припустили збільшення локальної експресії та/або зниження метаболізму в запалених дихальних шляхах при МВ. Рівень пептиду в МВ-мокротинні становив 177,4 (14,7) нг/мл, що було досить подібним до рівня БАЛ, що свідчить про те, що мокротиння є легкодоступним і репрезентативним зразком секрету дихальних шляхів для вимірювання рівнів hCAP18/LL-37 [18]. Зазвичай концентрація АМП залежить від віку учасників дослідження та тяжкості захворювання легень [97].

В той же час існує думка, що концентрація АПМ залежить та відображає ступінь ураження легень. Менші рівні hCAP-18/LL-37 характерні для менш розвиненого ураження легень, зокрема для пацієнтів дитячого віку порівняно з дорослими. Зниження концентрації hBD-2 в мокротинні дітей з МВ можна пояснити. У мікрооточенні МВ-легенів *P. aeruginosa* зазнає значних генетичних і фенотипових трансформацій, мутує до мукоїдного морфотипу з дефіцитом джгутиків під час хронічної легеневої інфекції. Зміни експресії факторів вірулентності *P. aeruginosa* впливають на експресію hBD-2 в легеновому епітелії, що послаблює вроджений імунний захист легенів [98].

Інша хронічна патологія також пов'язана зі зміною експресії неспецифічних імунних маркерів. *Sakir та ін.* (2014) вивчали концентрацію кателіцидину та hBD-2 у БАЛ дітей, хворих на туберкульоз легень. Середнє значення рівня hCAP-18/LL-37 в групі дослідження було достовірно вищим, ніж у групі контролю ($p = 0,01$) – 0,95 (1,33) нг/мл та 0,35 (0,51) нг/мл відповідно. Рівень hBD-2 також був вищим у групі дослідження; однак різниця не була статистично значущою – 0,30 (0,58) та 0,14 (0,30) нг/мл відповідно [99].

Концентрацію hBD-2 у БАЛ дорослих суб'єктів також вимірювали *Hiratsuka та ін.* (2003). Вони показали, що концентрація hBD-2 у здорових учасників становить 0,3 (0,2) пг/мл і знаходиться в достовірно нижчих концентраціях, ніж у пацієнтів з дифузним панбронхіолітом – 71,5 (28,7) пг/мл [100]. Результати, отримані *Ross та ін.* (2004) показали, що концентрація hBD-2 у БАЛ здорових суб'єктів становить 204 (180) пг/мл. Навпаки, зразки пацієнтів, які перенесли трансплантацію легень у зв'язку з облітеруючим бронхіолітом, містять близько 1270 (430) пг/мл hBD-2 [101].

Група дослідників вивчала концентрацію hBD-2 і hCAP-18/LL-37 у дітей з алергічною патологією. *Віленський та ін.* (2021) показали, що орофарингеальний секрет здорових дітей містить близько 251 (248; 253) пг/мл hBD-2 і 0,89 (0,83; 0,92) нг/мл LL-37. Порівняно з ними у дітей з atopічною астмою концентрація досліджуваних АМП була знижена – 195 (190;197) пг/мл ($p=0,0281$) та 0,43 (0,41; 0,46) нг/мл ($p=0,038$) відповідно. Вони припустили існування імунного виснаження у випадку хронічного запалення [8].

У фундаментальному дослідженні *Ghosh та ін.* (2007) оцінювали вміст АМП у слині та БАЛ. Показано, що концентрація hBD-2 у здорових людей коливається в межах 9,5 (1,2–21) мкг/л, а в БАЛ становить 0,04 (0 – 0,049) мкг/г. Проте коливання вмісту hBD-2 у слині та БАЛ не синхронізовані [102, 103].

1.6 Сучасні підходи до корекції респіраторного мікробіому при муковісцидозі

Як обговорювалося вище, зростаюча поширеність резистентності до антибіотків, а також фізіологічні, мутаційні та трансмісивні механізми патогенів асоційованих з МВ є основними причинами терапевтичної невдачі. Тактика менеджменту залежить від стадії респіраторної інфекції та залучених патобіонтів. Профілактика все ще викликає суперечки, і, як правило, полягає в ранній ерадикації *P. aeruginosa*, *S. aureus* та *MRSA* з метою запобігання хронічної інфекції [72, 73, 74].

Протимікробні засоби. Для хронічної інфекції при МВ характерним є прогресуюче зниження функції легень, що корелює з мукоїдною конверсією *P.*

aeruginosa, фенотиповою диверсифікацією *S. aureus*, утворенням біоплівки та розвитком резистентності. На цій стадії бактеріальна маса збільшується, що призводить до бронхолегеневих загострень. Часті загострення пов'язані з погіршенням якості життя та підвищенням смертності. Ерадикація хронічної інфекції досягається рідко, особливо у пацієнтів з хронічною колонізацією *P. aeruginosa*, тому метою антимікробного лікування є зменшення бактеріального навантаження і, таким чином, інтенсивності запальної відповіді [72]. Успіх у зменшенні мікробного навантаження мікробіологічно визначається як зменшення кількості бактерій принаймні на два логарифми при порівнянні двох послідовних культур. Традиційно для лікування загострень застосовують внутрішньовенні антибіотики. Класична стратегія полягає в поєднанні двох препаратів з різних класів антимікробних засобів для підвищення ефективності лікування та попередження появи антимікробної резистентності. Наприклад, для лікування *P. aeruginosa* зазвичай використовується комбінація аміноглікозиду або фторхінолону та антипсевдомонального β -лактаму у високих дозах. Колістину сульфаметат також показав ефективність при внутрішньовенному введенні окремо або в комбінації; однак він зазвичай є препаратом вибору для стійких ізолятів або у випадках терапевтичної невдачі. З іншого боку, інгаляційна терапія є методом вибору при супресивній або підтримуючій терапії хронічної інфекції за відсутності загострень. Інгаляційне введення антибіотиків виявилось безпечним і ефективним завдяки високим концентраціям у вогнищі інфекції з дуже низьким системним ефектом. Оскільки ерадикацію неможливо досягти, стратегія базується на хронічній супресивній терапії (колістин) або призначенні 28-денного курсу тобраміцину або азтреонаму. Небулайзерне введення колістметату натрію продемонструвало ефективність при лікуванні хронічної інфекції *P. aeruginosa* [74].

Схеми дозування ґрунтуються на зміні концентрації антибіотика протягом курсу лікування (фармакокінетика – ФК) та на взаємозв'язку *in vitro* між концентрацією антибіотика та швидкістю росту або загибелі цільових мікроорганізмів (фармакодинаміка – ФД). Ці фактори об'єднані в індекс ФК/ФД,

який використовується для оцінки потенційної ефективності схем лікування антибіотиками [73, 103].

Аміноглікозидні та фторхінолонові антибіотики проявляють концентрація-залежну активність. Параметрами ФК/ФД, які краще прогнозують їхню активність, є відношення C_{max}/MIC (C_{max} – максимальна концентрація, MIC – мінімальна інгібуюча концентрація). Ці антибіотики застосовуються у високих дозах, а їх тривалий постантибіотичний ефект дозволяє використовувати препарати з тривалими інтервалами між дозами [73]. Аміноглікозиди мають змінену ФК у дорослих і дітей із МВ та погано проникають в легеневу тканину при парентеральному введенні. Тож, рекомендації щодо дозування для внутрішньовенного введення аміноглікозидів не можуть гарантувати адекватного досягнення цільового ФК/ФД (співвідношення C_{max}/MIC принаймні > 10). Введення за допомогою небулайзера забезпечує вищі концентрації в легенях та має мінімальний системний ефект: рівень гентаміцину в легенях після системного та інгаляційного введення становить $\leq 1,0$ мг/л та 400 мг/л відповідно; тобраміцину після інгаляції – в сироватці крові менше 1 мг/л, в мокротинні досягає 1200 мг/л. Розпилений амікацин швидко дифундує в системний кровотік, потенційно проявляючи системну токсичність [103]. Інгаляційний спосіб введення також розширяє можливості застосування фторхінолонів, зокрема ципрофлоксацину і левофлоксацину [73].

Активність β -лактамних антибіотиків є час-залежною; таким чином, для досягнення оптимального терапевтичного ефекту концентрації повинні бути вище MIC протягом тривалого періоду часу. Параметр $T > MIC$ повинен становити щонайменше 40–50% інтервалу введення та досягається внутрішньовенним введенням препарату (піперацилін/ тазобактам, цефтазидим, цефепім, меропенем або доріпенем) або інгаляцією тричі на день (азтреонам). В такому випадку параметри ФК/ФД є ефективними проти популяції чутливих клонів. Що стосується селекції резистентних мутантів, то концентрації антибіотика, які запобігали б їй запобігали, виражаються параметром, відомим як концентрація запобігання мутантів (K_{3M}) – MIC найменш чутливого одноетапного мутанта. Насправді

діапазон концентрацій антимікробних речовин від МІК до КЗП відомий, як вікно відбору мутантів. Передбачається, що концентрації протимікробних речовин, розміщені всередині цього вікна, сприятимуть селекції резистентних мутантних субпопуляцій, тоді як концентрації вище цього вікна, обмежать накопичення резистентних клонів [73].

ФК піперациліну у пацієнтів з МВ є нелінійною і дозо-залежною. Пацієнти з МВ потребують вищих доз піперациліну для досягнення цільових рівнів у сироватці крові порівняно зі здоровими особами. Піперацилін-тазобактам зазвичай вводять шляхом внутрішньовенної інфузії. ФК піперациліну не змінюється при додаванні тазобакаму, але антибіотик знижує нирковий кліренс протектора. Дослідження ФК/ФД показали, що для лікування інфекції *P. aeruginosa* доза піперациліну має бути не менше 600 мг/кг/добу, розділена на 4–6 прийомів; МІК у дорослих і дітей з МВ є вищою, ніж в загальній популяції [103].

Меропенем є карбапенемом, що характеризується широким спектром антибактеріальної дії *in vitro*. Високодозові режими з використанням безперервної (протягом 24 год) або тривалої (понад 3 год) інфузії були запропоновані як спосіб підвищення ефективності меропенему, особливо при лікуванні важких та/ або резистентних інфекцій [104]. На основі параметрів ФК/ФД меропенему встановлено, 2 г кожні 8 годин (40 мг/кг кожні 8 годин у дітей) є рекомендованою дозою для лікування бронхолегеневих інфекцій у пацієнтів з МВ [103].

Азтреонам є монобактамом, який виявляє сильну та специфічну активність *in vitro* проти широкого спектру грам-негативних аеробних патогенів, включаючи *P. aeruginosa*. Приблизно 20% внутрішньовенної інфузії азтреонаму проникає в бронхіальний секрет, але дуже високі концентрації можуть бути досягнуті за допомогою небулайзерного введення його солі [73]. Зараз активно обговорюється можливість використання комбінації азтреонаму з цефтазидимом/ авібактамом або меропенемом/ ваборбактамом для лікування інфекцій, спричинених *Enterobacteriaceae*, що продукують метало- β -лактамази та серинові- β -лактамази [105].

Цефтолозан-тазобактам є комбінацією цефалоспоринової та інгібітора β -лактамази з високою ефективністю проти мультирезистентної *P. aeruginosa* у пацієнтів із МВ [106]. Співвідношення концентрації препарату легені/ плазма сягає близько 46%. Рекомендоване дозування при легеневої інфекції: 3 г (2 г цефтолозану/1 г тазобактаму) кожні 8 годин, вводять у вигляді 1-годинної інфузії [103].

Цефтазідим-авібактам є активним проти деяких карбапенемаз, що виробляються грам-негативними мікроорганізмами, зокрема *P. aeruginosa* та *V. serpens* complex. Його проникнення в легені оцінюється приблизно в 30%. Препарат слід вводити кожні 8 годин протягом 2 годин [103]. У дослідженнях ФК/ФД цефтазидиму-авібактаму серед пацієнтів з МВ, показано, що введення 2,5 г препарату протягом 2 годин кожні 8 годин забезпечує параметри ФК подібні до для здорових дорослих [107].

Цефтаролін і цефтобіпрол є цефалоспоринами ефективними проти MRSA. Цефтаролін можна вводити кожні 12 годин, але 1-годинна інфузія кожні 8 годин рекомендована при важких системних інфекціях та лікуванні бронхолегеневих загострень у пацієнтів із МВ [73, 103]. Показанням до застосування глікопептидів та оксазолідинонів є грам-позитивні інфекції, в тому числі MRSA [103].

Зазвичай для лікування інфекцій дихальних шляхів при МВ використовуються комбінації антибіотиків з метою попередження або відстрочення виникнення резистентності [71, 72, 73].

Іншим підходом для запобігання або відстрочення виникнення резистентності може бути використання послідовного призначення антибіотиків з урахуванням антагоністичної резистентності. Лікування аміноглікозидами часто призводить до селекції мутантів, які надмірно експресують ефлюксний насос MexXY-OprM, пов'язаний з інактивацією MexAB-OprM. Беручи це до уваги, теоретично лікування субстратами MexXY-OprM (такими як тобраміцин) може призвести до гіперчутливості до субстратів MexAB-OprM (наприклад, азтреонаму). Отже, послідовне лікування тобраміцином з подальшим азтреонамом принесе клінічну користь за рахунок підвищення терапевтичної ефективності та зменшення

селекції резистентних клонів. В подвійному сліпому плацебо-контрольованому багатоцентровому дослідженні з використанням комбінації фосфоміцин/тобраміцин та азтреонаму показано, що безперервна почергова терапія різними інгаляційними антибіотиками може бути корисною для пацієнтів з МВ [73].

Іншою тактикою є модуляція оксидативного стресу. Показано, що додавання антиоксидантів, таких як L-пролін, N-ацетилцистеїн, β -каротин і L-цистеїн, знижує стійкість 5-денних біоплівки *P. aeruginosa* до тобраміцину *in vitro*. N-ацетилцистеїн вже давно використовується у пацієнтів з МВ як муколітичний засіб, а також як протизапальний препарат. Хоча для оцінки його використання як підсилювача антибіотичної активності на біоплівках необхідні клінічні випробування, комбінація N-ацетилцистеїну та деяких антибіотиків виглядає багатообіцяючою [73, 74].

Націлення на біоплівку. Було показано, що мінімальна концентрація ерадикації біоплівки може бути в 100–1000 разів вищою за МІК антибіотиків проти планктонним бактерій. Досягти таких концентрацій антибіотиків системно (пероральне або внутрішньовенне введення), або через розпилення та інгаляцію, важко. Тож, стає необхідним оцінити способи, за допомогою яких антибіотики можуть бути ефективними в якості антибіоплівкових агентів. Дія багатьох антимікробних засобів обмежена характеристиками бактеріальних біоплівок – β -лактами, фторхінолони та аміноглікозиди націлені на метаболічно активні клітини. Навпаки, персистентні клітини вбудовані в матрикс не піддаються впливу. Компоненти самого матриксу створюють фізичний бар'єр для розсіювання та проникнення антимікробних засобів [76]. Дослідження *in vitro* на *P. aeruginosa* продемонструвало, що використання тобраміцину вбиває лише метаболічно активний шар клітин дистальних відділів біоплівки, не маючи можливості проникнути всередину клітинного агрегату. Навпаки, поліміксиновий антибіотик колістиметат натрію діє як катіонний детергент і зв'язується з негативно зарядженим ліпополісахаридом, присутнім у зовнішній мембрані *P. aeruginosa*, і не вимагає метаболічної активності мікроорганізму для активної протимікробної дії [108].

Однією зі стратегій оптимізації доставки антибіотиків до клітин вбудованих в біоплівку є ліпосомальні препарати. Фосфоліпідні везикули, в які інкапсульовані

антибіотики, можуть зливатися з клітинними мембранами, забезпечуючи проникнення препарату в мікробну клітину. Пенетрація в глибокі шари біоплівки показана з використанням ліпосомального амікацину проти інфекції НТМ і *P. aeruginosa* [109].

АМП — це клас природних і синтетичних білків, які значно відрізняються за розміром і функціями. Було показано, що використання катіонних АМП ефективно зменшує біомасу біоплівки при застосуванні в комбінації з тобраміцином проти мультирезистентних ізолятів *P. aeruginosa* при МВ [76, 78, 84].

Серед інших терапевтичних стратегій, в останні роки були розроблені більш цілеспрямовані підходи до лікування інфекцій, викликаних *P. aeruginosa*. Новітні механізми менеджменту інфекції спрямовані на різні компоненти відповідальні за регуляцію структури та дисперсію біоплівки, почуття кворуму та метаболізм заліза. Біспецифічні моноклональні антитіла досліджуються, як перспективний агент для лікування інфекції *P. aeruginosa*. Анти-Psl, анти-PcrV (білок системи секреції III типу) і BiS4αPa (відомий як MEDI3902) продемонстрували свою потенційну ефективність як для лікування, так і для профілактики інфекції. Моноклональні антитіла, націлені на сімейство бактеріальних ДНК-зв'язуючих білків – компонента біоплівки, що підтримує структурну стабільність. Були продемонстровані багатообіцяючі експериментальні результати, але включення в клінічні випробування є достатньо складним. Потрібні майбутні дослідження щодо розробки більш передових методів, спрямованих на забезпечення високопродуктивної та специфічної діагностики на ранній стадії колонізації *P. aeruginosa* до розвитку біоплівки. В той же час, більш глибоке розуміння молекулярних шляхів, які регулюють життєвий цикл біоплівки *P. aeruginosa*, вимагає подальшого досліджень, які могли б забезпечити обґрунтоване рішення щодо розробки терапевтичних стратегій, які можуть погіршити здатність прикріплення бактерій і дозрівання біоплівки [74].

Пробіотичні мікроорганізми. Оскільки пробіотики не можуть справляти селективний тиск на хіміотерапевтичну резистентність мікроорганізмів та мають низьку цитотоксичність, їх можна розглядати як ідеальний варіант в якості

протибіоплівкових агентів при МВ. Пробіотичні мікроорганізми мають різноманітні механізми впливу на патогені бактерії та їх адгезію до поверхонь. Пробіотики пригнічують функціонування системи сприйняття кворуму, утворення біоплівки та перешкоджають збереження сталості її мікросередовища та архітектури. Генетично детерміновані механізми такого впливу полягають в секреції бактеріоцинів, екзополісахаридів, молочної кислоти, жирних кислот, ферментів (амілази, ліпази), перекису водню, які забезпечують появу несприятливих умов навколишнього середовища для патогенів (зміна рН, конкуренція за поверхню та поживні речовини) [110].

Результати різних досліджень вказують на багатообіцяючу перспективу використання пробіотиків для менеджменту захворювань з системним запальним синдромом, зокрема серцево-судинних, та запальних захворювань кишечника. В ряді клінічних випробувань показано вплив пробіотичних і симбіотичних добавок на кишкові прояви та якість життя пацієнтів із МВ [111]. В останньому систематичному огляді з включенням 12 рандомізованих плацебо-контрольованих досліджень, загальна кількість пацієнтів – 464, показано, що включення пробіотиків до стандартної схеми лікування може суттєво зменшувати рівень локального запалення в кишечнику, оцінений за допомогою фекального кальпротектину, а також мати вплив на бронхолегеневі загострення у дорослих та дітей з МВ [112]. Тож, потенційне використання пробіотичних бактерій для попередження та затримки колонізації легень патобіонтами асоційованими з МВ або лікування наявної інфекції викликало значний інтерес в останні роки. Перевага використання пробіотиків при МВ може бути подвійною: з одного боку, вони можуть прямо чи опосередковано сприяти елімінації збудників, з іншого боку – вони є ефективними у відновленні/ підтримці еубіозу, а отже, потенційно можуть сприяти зменшенню частоту рекурентних інфекцій та/або загострень [113].

Більшість пробіотичних препаратів містять бактерії (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) та гриби (*Saccharomyces boulardii*). Було показано, що окрім впливу безпосередньо на патогени, пробіотичні мікроорганізми здатні модулювати імунну функцію за рахунок

активації протизапальних механізмів вродженого імунітету та стимуляції адаптивної імунної відповіді. Основні види, які демонструють імунну модуляцію, включають *Lactobacillus*, *Bacillus* і *Bifidobacterium*, а також рід *Saccharomyces* [113].

На додаток до локально спрямованого впливу на екологію кишечника, поступово накопичуються докази того, що при МВ пробіотики можуть справляти непрямий вплив на мікробіом легень через вісь кишечник – легені. Молекулярні механізми, задіяні в цих процесах, є складними і ще далекими від повного з'ясування. Вважається, що вплив кишкової мікробіоти на функції легень в основному опосередковується імунними механізмами, які встановлюються між кишечником і легеньми через системний кровоток та лімфу. Окрім того, є також припущення про пряму транслокацію метаболітів та/ або мікробів з кишечника в дихальні шляхи. Здатність пробіотичних штамів модулювати місцеву та системну імунну відповідь пов'язана з експресією різних мікроорганізм-асоційованих молекулярних патернів (МАМП) (ліпополісахариди, ліпотейхоева кислота, пептидоглікан, флагеллін, СrG-ДНК, поверхневі білки), на які реагують патерн-розпізнаючі рецептори (ПРР) епітелію та клітин вродженого імунітету хазяїна – Toll-подібні рецептори, NOD-подібні рецептори, рецептори типу С-лектину). Взаємодія між МАМП і ПРР призводить до активації каскаду сигналів з активацією фактору NF- κ B і експресією багатьох генів, відповідальних за реакції вродженого імунітету і, зокрема, запалення. Цитокіни, хемокіни та інші імуномодулятори хазяїна з кишечника також можуть потрапляти в системний кровообіг, і проявляти свою дію у легенях при МВ. Набір МАМП пробіотичних мікроорганізмів є штам-специфічним, а отже, може свідчити про те, що різні пробіотики можуть викликати різні імунологічні реакції [114].

Системні ефекти пробіотиків можуть бути опосередковані в тому числі дендритними клітинами. Пробіотики взаємодіють із дендритними клітинами та інтерналізуються ними. Дендритні клітини транслокуються до регіонарних лімфатичних вузлів, приймають участь в активації Т-клітин, в тому числі регуляторного пулу, і стимулюють продукцію регуляторних цитокінів IL-10, TGF- β , IFN- γ та IL-6 [112, 114].

Іншим механізмом сполучення осі кишечник-легені можуть бути мікробні метаболіти, зокрема коротко-ланцюгові жирні кислоти, продукти мікробної ферментації харчових волокон (ацетат, бутират, пропіонат). Бутират має широку протизапальну дію через пригнічення ліпополісахарид-індукованої активації NF- κ B [114].

Також існує припущення про те, що між кишечником і легеньми може відбуватися пряма мікробна транслокація [114]. Наприклад, мікробіом кишечника та дихальних шляхів дітей раннього віку з МВ демонструє певний ступінь спорідненості, де домінують *Veillonella* та *Streptococcus*. Спостереження щодо модифікації кишкового та респіраторного мікробіому в ранньому дитячому віці у дітей з МВ в залежності характеру харчування показують, що колонізація кишечника є передвісником появи певного роду мікроорганізмів в дихальних шляхах. Такі дані мають виняткове значення, оскільки свідчать про те, що конкретні дієтичні або пробіотичні втручання можуть бути ефективним способом протидії колонізації легень при МВ [115]. Важливо відзначити, що вплив кишечник-легені може бути двонаправленим. Тобто кишкова мікробіота впливає на легені, але зв'язок у протилежному напрямку призводить до зміни локального запалення в кишечнику [114].

Дослідження з використання пробіотичних мікроорганізмів в основному включали використання *Lactobacillus* пероральним та інгаляційним шляхами. Інгаляційні пробіотики можуть безпосередньо конкурувати з патогенами за адгезію до слизової оболонки дихальних шляхів та перешкоджати їх росту, підвищувати цілісність бар'єру слизової оболонки і стимулювати місцеву імунну відповідь, пригнічуючи надмірну запальну реакцію [112, 114]. Дослідження на білих мишах з експериментальними моделями легеневої інфекції *P. aeruginosa* показали, що ендотрахеальне введення коктейлю з *Lactobacillus fermentum* K.C6.3.1E, *Lactobacillus paracasei* ES.D.88, *Lactobacillus zeae* Od.76 призводить до зменшення мікробного навантаження в дихальних шляхах [116]. Дослідження з використанням клінічних ізолятів *P. aeruginosa*, отриманих від хворих на МВ, показали, що *Lactobacillus* здатні пригнічувати експресію двох основні фактори вірулентності, що

регулюються почуттям кворуму – еластази та піоціаніну [117]. Загалом представники роду *Lactobacillus* мають суттєву доказову базу щодо активності проти патобіонтів асоційованих з МВ, зокрема *P. aeruginosa* та *S. aureus* [114, 115, 116, 117].

Але не тільки рід *Lactobacillus* є пробіотиками з потенційними респіраторними ефектами. Інтраназальне вводили *Streptococcus salivarius* 24SMB при прямо зменшенні частоти гострого середнього отиту у дітей дошкільного віку [114]. Про сприятливий вплив *Bacillus subtilis* на імунні реакції у людей похилого віку повідомляли Lefevre та ін. (2015). В групі пробіотиків спостерігалася значно менша частота респіраторних інфекцій порівняно з контрольною [118]. Інтраназальне введення *B. clausii* було ефективним засобом лікування дітей з респіраторно-синцитіальною інфекцією зі скороченням тривалості клінічних проявів, зменшенням вірусного навантаження та запальної реакції в дихальних шляхах дітей раннього віку [119].

Перспективним також є використання еубіотів. Показники активності мікроорганізмів роду *Aerococcus* дозволяють віднести їх до нормальної мікробіоти та використовувати в якості основи для пробіотиків. Як було описано, *A. viridans* широко представлений в складі мікробіому людини [36, 120, 121]. Корисна дія *A. viridans* на організм хазяїна підтверджена лабораторними дослідженнями і клінічними спостереженнями на прикладі штаму 167 і деяких симбіонтних ізолятів [113, 122, 123, 124].

Відомо, що легеневе середовище при МВ має специфічні особливості зумовлені дисфункцією ТРБМ, що призводить до накопичення густого слизу, гіперсекреції муцинів, нейтрофільної інфільтрації, змінени рН рідини на поверхні дихальних шляхів та накопичення високого рівня позаклітинної ДНК [33, 34, 35]. Це піднімає питання про те, чи мають пробіотичні штами здатність ефективно колонізувати легені при такій зміні мікросередовищі. Дослідження свідчать про те, мікробіом дихальних шляхів пацієнтів з МВ містить представників роду *Lactobacillus*, зокрема *Lactobacillus rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei* та *Lactobacillus gasseri*. А отже, вони мають потенціал життєздатності в дихальних

шляхах хворих на МВ [104]. *A. viridans* також володіють високим колонізаційним потенціалом, є стійкими до низьких значень рН та антимікробних субстанцій ендогенної мікробіоти, що важливо для мікросередовища дихальних шляхів при МВ. Представники роду *Aerococcus* мають хороший адгезивний потенціал та показали ефективність на експериментальних моделях інфекцій [122, 123, 124, 125]. *A. viridans* мають високу швидкість росту і розмноження в полімікробних умовах, мають стабільні характеристики. Все вищезазначене частково розкриває потенціал симбіонтів роду *Aerococcus* в якості використання для корекції порушень мікробіоценозів та спонукає до детального вивчення їх антагоністичних властивостей відносно патобіонтів асоційованих з МВ [113, 122].

1. 7 Особливості мікробіологічного моніторингу при муковісцидозі

Хронічна бронхолегенева інфекція при МВ розглядається як основний фактор захворюваності та смертності. Бронхолегеневе загострення визначається як раптове нещодавнє погіршення клінічних симптомів. Зазвичай причиною є легенева інфекція, яку можна підтвердити шляхом виявлення культури патогену у зразках взятих з дихальних шляхів [28, 71].

Виходячи з вище сказаного, клінічний мікробіолог з досвідом/ навичками роботи в області МВ повинен бути частиною мульти-дисциплінарної команди (МДК), що надає допомогу хворим на МВ. За напрямком професійної підготовки його роль також може виконувати спеціаліст в області інфекційних захворювань або науковець з необхідними знаннями та досвідом в клінічній мікробіології. Окрім хороших базових знань, клінічний мікробіолог має бути сертифікованим спеціалістом та відвідувати наукові заходи та конференції присвячені МВ. Клінічний мікробіолог має тісно співпрацювати з усіма відділами діючої мікробіологічної лабораторії та локальною командою з інфекційного контролю. Для надання допомоги клініцистам з приводу діагностики та лікування інфекцій, клінічний мікробіолог повинен мати знання про широке коло патогенів, асоційованих з МВ. Зокрема, має бути обізнаним про можливі незвичайні

мікроорганізми, ризики перехресного інфікування та впливу тривалої хронічної інфекції на мікробіологічне дослідження та лікування [28, 72, 126].

Мікробіологічна лабораторія повинна мати можливість забезпечити повний набір тестів, необхідних при МВ. Організація роботи з біологічним матеріалом має виконуватися відповідно до прийнятих керівництв [28, 38, 127]. Лабораторія повинна надавати точні та своєчасні результати МДК МВ за узгодженою схемою, в тому числі невідкладно повідомляти важливі результати. Працівники лабораторії повинні мати достатню кваліфікацію та знання для роботи з широким спектром патогенів асоційованих з МВ.

В лабораторії повинна існувати система розслідування помилок та інших інцидентів, разом з доказами того, як отриманий досвід використовуються для покращення якості роботи. Бажано, щоб мікробіологічна служба проходила внутрішній та зовнішній аудит. Прикладами аудитів є оцінка часу виконання дослідження (тобто час між отриманням зразка в лабораторії та часом, коли результат буде доступним для МДК МВ), точність ідентифікації та тестування на чутливість, а також відповідне та швидке повідомлення термінових результатів).

Лабораторна служба та МДК МВ мають погодити:

- зразки з дихальних шляхів, які мають бути відібрані для дослідження – мокротиння, промивні води бронхоальвеолярного лаважу, кашльовий мазок, орофарингеальний мазок;
- зразки, які мають бути відібрані у випадку катетер-асоційованої інфекції;
- зразки для діагностики інших інфекцій, в тому числі при проявах ентериту (кишкові віруси; коли і як тестувати на токсин-продукуючий анаероб *Clostridioides difficile*);
- в кожному конкретному випадку необхідний рівень ідентифікації отриманої культури – вид, рід тощо. Деякі дослідження можуть бути проведені в лабораторії з ширшими діагностичними можливостями (підтвердження вперше виявленої інфекції *Burkholderia spp.* з точною видовою ідентифікацією);

- метод та частоту визначення забору матеріалу (як часто МДК МВ має надсилати зразки для рутинного нагляду та коли додатковий забір має бути виконаний при підозрі на перехресне інфікування);
- визначення протисиньогнійних антитіл за необхідності;
- доступність діагностичних тестів для грибів та мікобактерій з рівнем ідентифікації та роль їх визначення;
- чутливість до антибіотиків – згідно рекомендацій EUCAST (останні оновлення);
- бажано, щоб мікробіологічна служба мала можливість швидко ідентифікувати віруси, які можуть поширюватися між пацієнтами – відомі патогени (напр., вірус грипу) та емерджентні (напр., коронавіруси);
- які саме результати мають бути невідкладно повідомлені по телефону МДК МВ – вперше виявлена інфекція *P. aeruginosa*, нове виділення *B. ceracia complex* та інші види *Burkholderia*, *MRSA*, вірогідну присутність *Mycobacterium spp.* в мокротинні тощо;
- рекомендації з організації інфекційного контролю.

Крім того, має бути узгоджено надійну структуру для комунікації між лабораторною службою та МДК МВ (наприклад, телефонний контакт, участь у зустрічах МДК МВ тощо).

Мікробіолог повинен співпрацювати з МДК МВ для розробки рекомендацій щодо використання антимікробних препаратів, включаючи вибір тактики при ерадикації нової інфекції, лікування загострення та довготривалих пригнічуючих антибіотиків. Метою є зниження захворюваності, частоти та тривалості госпіталізацій, а також відповідальне використання антибіотиків для стримування розвитку резистентності. Має бути можливість до моніторингу лікарських засобів та антибіотиків [28, 72, 126].

Клінічний мікробіолог повинен співпрацювати з МДК МВ та місцевою командою з інфекційного контролю над розробкою місцевої політики та процедур з контролю та профілактики інфекції відповідно до національних та міжнародних рекомендацій [2, 16, 17, 18]. Ця політика повинна включати:

- ведення пацієнтів з трансмісивними інфекціями з заходами зі стримування поширення агенту;
- нагляд за трансмісивними інфекціями (наприклад, як часто проводити скринінг і які зразки надсилати в лабораторію);
- антибактеріальна терапія носіїв потенційно трансмісивних мікроорганізмів;
- рекомендації для персоналу;
- розслідування спалахів;
- обслуговування приміщення – прибирання, технічне обслуговування обладнання, реконструкція чи перебудова відділення.

Клінічний мікробіолог може приймати активну роль у проведенні клінічних досліджень з МВ, в тому числі забезпечуючи надійну та точну лабораторну підтримку. Клінічний мікробіолог також може допомогти забезпечити доступність результатів центру для національних та міжнародних баз даних [27, 72, 126].

Метою мікробіологічного моніторингу при МВ є нагляд за інфікуванням новими патогенами стабільних пацієнтів та діагностика бронхолегеневого загострення при погіршенні стану. Мікробіологічний моніторинг є обов'язковою частиною поточної та щорічної оцінки стану легень на ряду з визначенням функції зовнішнього дихання [28, 71].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Дизайн дослідження

Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Дніпровського державного медичного університету (Дніпро, Україна). Обстеження пацієнтів проводилося в період з листопада 2018 року по грудень 2021 року. Попередньо дослідження було схвалено комісією з питань біомедичної етики ДЗ «Дніпропетровська медична академія» (протокол №8, 17.10.2018 та протокол №3, 16.11.2022 р.). Дослідження згідно чинної нормативно-правової документації, зокрема Наказу МОЗ України №723 від 15.07.2016; Наказу МОЗ України №2415 від 3.11.2021; наказу МОЗ України №1614 від 03.08.2021. Реєстрація мікробіологічних досліджень – ф252/о відповідно до Наказу МОЗ України №1 від 04.01.2001 (зі змінами Наказ МОЗ України №693 (v0693282-05) від 08.12.2005). Батьки або законні представники дітей дали згоду на участь у дослідженні, на збір та обробку персональних даних та були проінформовані про мету та задачі дослідження. Для кожного пацієнта було оформлено протокол дослідження з зазначення результатів мікробіологічного та імунологічного дослідження. Ризик та незручності пов'язані з участю у дослідженні передбачали дискомфорт при заборі матеріалу ватним тампоном з ротоглотки та носоглотки учасника. Додаткових незручностей чи ризиків не було.

Очікувана користь для учасника дослідження передбачала безкоштовне мікробіологічне дослідження біологічного матеріалу, що дозволяло клініцистам приймати обґрунтовані рішення щодо корекції антибіотикотерапії.

Тип дослідження – одноцентрове проспективне дослідження з описом серії випадків. Дизайн дослідження схематично зображений на рис. 2.1.

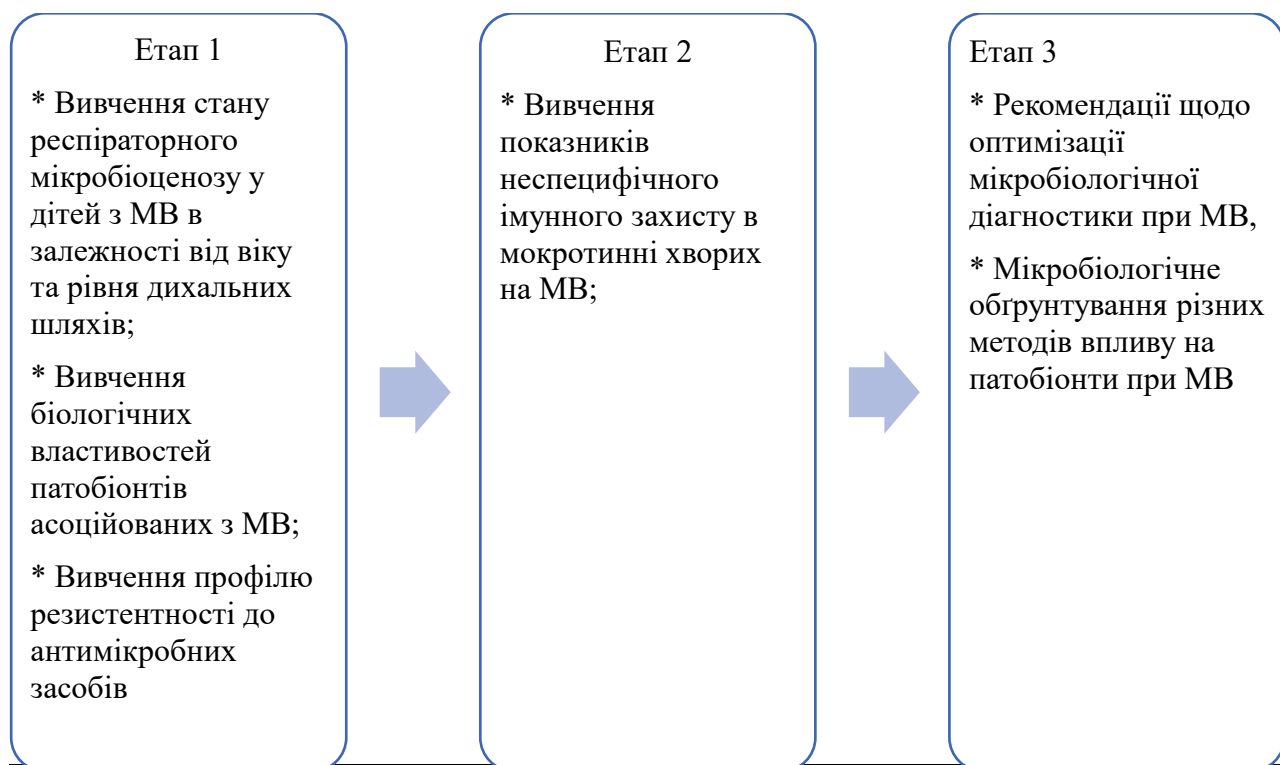


Рис. 2.1 Дизайн дисертаційного дослідження

2.2 Загальна характеристика пацієнтів задіяних в дослідженні

В дослідження були включені діти віком від 0 до 17 років 11 місяців 29 днів з молекулярно-генетичним підтвердженням діагнозу МВ. До критеріїв виключення відносили вік старше 18 років та відсутність молекулярно-генетичного підтвердження діагнозу МВ.

У дослідженні взяли участь 32 дитини (16 хлопчиків і 16 дівчат) віком від 2 місяців до 18 років, середній вік включення в дослідження становив 9,26 (0,35) років. На кінець дослідження дослідна група включала 28 дітей: троє учасників виключені через переїзд та зміну місця проживання, а і ще одна дитина через те, що їй виповнилося 18 років. Розподіл дітей за віком наведений в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл учасників дослідження, отриманих зразків та відновлених ізолятів за віком, 2019-2021 рр.

Вікова категорія, років	Пацієнти з МВ		Зразки		Ізоляти		Видове навантаження, 1 зразок
	Абсолютна кількість, п	Частка, %	Абсолютна кількість, п	Частка, %	Абсолютна кількість, п	Частка, %	
До 2	3	9,4	18	5,7	36	4,6	2,0
2-6	4	12,5	42	13,3	100	13,0	2,4
6-12	13	40,6	148	47,1	306	39,4	2,1
12-15	8	25,0	59	18,7	181	23,3	3,1
Старші 15	4	12,5	48	15,2	153	19,7	3,2
Всього	32	100,0	315	100,0	776	100,00	2,5

Протягом 2019 – 2021 років було зібрано 315 проб з дихальних шляхів. Зразки включали мокротиння ($n = 121$), БАЛ ($n = 12$) та мазки з задньої стінки глотки та носоглотки ($n = 182$). Оскільки мазки з задньої стінки глотки та носоглотки відбиралися одночасно, для оцінки підраховувалася лише кількість унікальних ізолятів.

Розподіл кількості зразків за віком був диспропорційним, і більшість зразків отримано від дітей 6 – 12 років через найбільший розмір даної вікової групи. У дітей віком до 2 років зразки мокротиння відсутні через недосконалий кашльовий рефлекс; також не було потреби проводити забір БАЛ у даній групі.

У ході дослідження отримано 776 ізолятів від дітей з МВ. Усі відібрані зразки дали позитивний ріст, монокультура отримана в 1,03% випадків ($n = 8$). Загальна поширеність отриманих ізолятів становила 2,38 за 1 визначення. Найбільшим показник був серед дітей віком від 12 років. В той же час, родові та видові різноманіття у молодших дітей в порівнянні з підлітковим віком суттєво відрізнялося.

2.3 Методи досліджень

Для дослідження відбирали мокротиння та БАЛ, за відсутності – мазок з задньої стінки глотки та порожнини носа. Запланована мінімальна частота мікробіологічної оцінки складала 1 раз на 3 місяці, позапланово обстежували при погіршенні клінічного стану та для контролю ерадикації, за необхідності [1, 72, 132]. Схема мікробіологічного дослідження наведена на рис. 2.2.

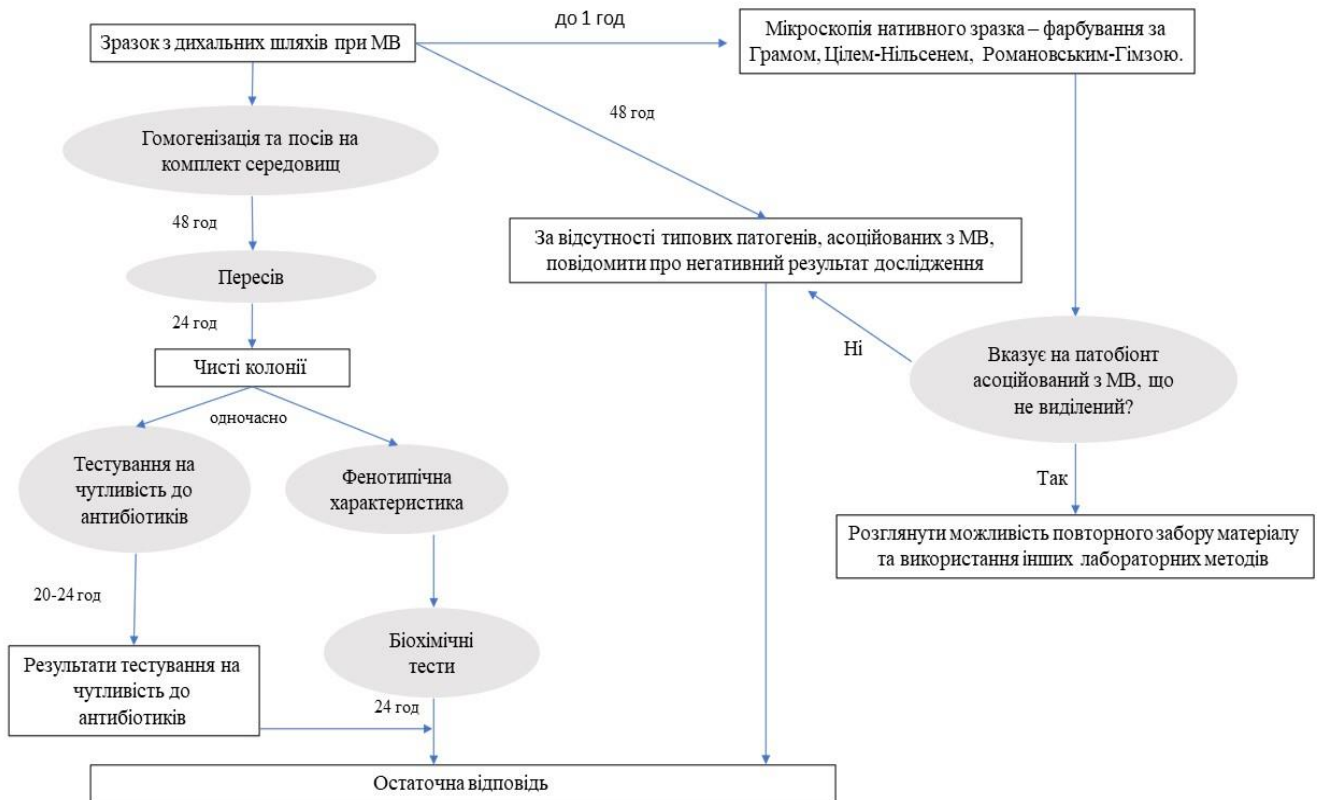


Рис. 2.2 Схема мікробіологічного дослідження при МВ

2.3.1 Виділення чистої культури та її ідентифікація

Забір та мікробіологічне дослідження клінічного матеріалу проводилися згідно з Європейським керівництвом з клінічної мікробіології, вказівками Європейського комітету з тестування на чутливість до антибіотиків та з урахуванням міжнародних рекомендацій щодо мікробіологічного моніторингу при МВ [140, 148, 149, 150, 132].

Забір матеріалу відбувався вранці до гігієнічного туалету та, бажано, щонайменше через 12 год. після останньої дози антибіотика. Отриманий біологічний матеріал *extempore* брали в роботу.

Оскільки мокротиння при МВ густе та в'язке, а мікроорганізми можуть непропорційно розташовуватися в різних компартментах зразка [11, 17], його обробляли 1 М дитіотреїтолу (Sputasol®, ThermoFisher Scientific, США) та центрифугували при 1 000 обертах протягом 20 хвилин [37, 136].

Отримані нативні зразки мокротиння та БАЛ підлягали мікроскопічному дослідженню з попереднім фарбуванням за методом Грама. Два рази на рік проводилося кислото-стійке фарбування за Ціль-Нільсенем [72, 133, 134].

Для оцінки інтенсивності та характеру інфільтрації в дихальних шляхах проводили фарбування отриманих зразків за Романовським-Гімзою, кількість клітин підраховували в камері Горяєва за формулою:

$$\text{Кількість клітин / мл} = \frac{\text{кількість клітин над великим квадратом}}{4} \times 10^6 \quad (2.1)$$

При оцінці характеру клітинної інфільтрації оцінювали долю нейтрофілів в пофарбованому зразку, %.

Аліквоти 20 мкл розрідженого та гомогенізованого зразка засівали на стандартний комплект поживних середовищ, показники росту – оцінювані показники росту щонайменше 10^2 КУО/мл. Кількісна оцінка росту в зразках, відібраних методом мазку, не представляється можливою, тому виражали напівкількісним методом – +, ++, +++, ++++ [140].

Для селективного виділення роду *Staphylococcus* використовували манітол-сольовий агар, для роду *Streptococcus* – відповідний селективний агар. Для виділення бактерій сімейства *Enterobacteriaceae* та інших невибагливих грам-негативних мікроорганізмів – середовище Ендо. Для селективного виділення *Haemophilus spp.* використали шоколадний агар з додаванням 8 мг/л цефзулодину. Для культивації *B. ceracia complex* використовували селективний агар (BCSA). Для селективного виділення *Pseudomonas spp.* використовували цетримідний агар з додаванням

гліцерину, проте негативний результат оцінювали з застереженням. Для виділення грибів патологічний матеріал засівали на агар Сабуро з гентаміцином. Для неселективної культивування та оцінки гемолітичної активності використовували колумбійський агар з 5% овечої крові [37, 72, 127, 140].

Засіяні чашки Петрі витримували в термостаті протягом 24-72 год при температурі 37°C. Чашки Петрі з кров'яним агаром, манітол-сольовим та цетримідним агаром залишали за кімнатної температури до 5 діб для виділення малих колоніальних форм *S. aureus* та *P. aeruginosa* відповідно [37, 127, 140]. Чашки Петрі з агаром Сабуро витримували до 7 діб (3 доби в термостаті та 4 за кімнатної температури) [140].

Для селективного виділення облигатних анаеробів та капнофілів використовували GenBox з реагентами для створення анаеробних капнофільних умов [140].

Ідентифікація мікроорганізмів проводилася з урахуванням морфологічних, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей згідно Визначником бактерій Берджі (2004). Для ідентифікації використали набори Mikro-La-Test, всі досліді з ідентифікації проводили в 3-кратному повторенні.

Грам-позитивні коки диференціювали за здатністю продукувати каталазу (10% розчин перекису водню). Для ідентифікації *Staphylococcus spp.* використали СТАФІтест 16, який має такі показники біохімічної активності: уреаза, аргінін, орнітин, β-галактозидаза, β-глюкуронідаза, ескулін, нітрати, фосфатаза, галактоза, сахароза, трегалоза, манітол, ксилоза, мальтоза, маноза, лактоза. Швидку ідентифікацію *S. aureus* проводили на основі наявності характерного пігменту, плазма-коагулазної активності та на хромогенному агарі (bioMérieux, Франція).

Для ідентифікації *Streptococcus spp.* та інших споріднених коків використовували СТРЕПТОтест 16, який має такі показники біохімічної активності: гіпурат, фосфатаза, лейцин амінопептидаза, β-глюкуронідаза, α-галактозидаза, ескулін, аргінін, уреаза, манітол, сорбітол, трегалоза, лактоза, рафіноза, інουλін, мелібіоза, рибоза. Гемолітичну активність визначали на кров'яному агарі.

Проводили пробу на чутливість до оптохіну та дезоксихолату. Досліди доповнені тестом на ацетоїн та гідроліз пірролідоніл- β -нафтіламід.

Грам-негативні мікроорганізми диференціювали за наявністю цитохромоксидази та здатністю ферментувати/ окислювати глюкозу в анаеробних умовах. Для ідентифікації сімейства *Enterobacteriaceae* використовували ЕНТЕРОтест 24N: уреаза, аргінін, орнітин, лізин, сірководень, цитрат Сіммонса, малонат, β -галактозидаза, саліцин, сорбітол, мелібіоза, целобіоза, лактоза, трегалоза, манітол, β -глюкуронідаза, дульцит, адонітол, арабітол, сахароза, інозітол, рафіноза, ескулін, β -ксилозідаза. Для ідентифікації не-ферментаторів та деяких ферментаторів глюкози використовували НЕФЕРМтест 24: аргінін, індол, уреаза, глюкоза, лізин, фруктоза, сахароза, інозитол, β -галактозидаза, фосфатаза, бета-глюкуронідаза, N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза, манітол, ксилоза, целобіоза, галактоза, нітрати, нітрити, ескулін, гамма-глутамілтрансфераза, лактоза, мальтоза, трегалоза, цитрат Сіммонса. Продукцію пігменту у *P. aeruginosa* визначали обсерваційним методом.

Ідентифікацію анаеробів проводили з використання АНАЕРОтест 23: індол, глюкоза, мальтоза, фруктоза, галактоза, лактоза, мелецитоза, уреаза, нітрати, сахароза, саліцин, трегалоза, манітол, рамноза, N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза, β -глюкуронідаза, ескулін, маноза, рафіноза, целобіоза, ксилоза, арабіноза, сорбітол.

Ідентифікацію грибів роду *Candida* проводили шляхом пересіву на хромогенне середовище (BioLife, Італія) та, за необхідності, з використанням КАНДІДАскрін тесту: уреаза, сахароза, мальтоза, лактоза, галактоза, трегалоза, целобіоза, пролін. Ідентифікацію пліснявих грибів проводили з урахуванням культуральних особливостей та морфології спорангію.

Згадані комерційні тест-набори дозволяли кожному ізоляту присвоїти 8-ми або 9-ти значний номер для подальшої ідентифікації за допомогою книги кодів, яка, в тому числі, давала змогу встановити відсоток точності ідентифікації, а також Т-індекс атиповості ізоляту. Книги кодів до вказаних наборів доступні онлайн, електронна адреса <https://www.eralachema.com>.

Ідентифікацію *Haemophilus spp.* проводили з урахуванням чутливості до факторів росту – X, V або X+V [140].

2.3.2 Визначення чутливості до протимікробних засобів.

Утворення біоплівки є провідним фактором, відповідальним за невдачу терапевтичних практик при МВ. Описано різні методи тестування біоплівок на чутливість до антибіотиків, але, на сьогодні, жоден з методів не є валідованим та рекомендованим для рутинного використання в клінічній практиці. В 2015 році (оновлення 2017 рік) *Waters et al.* опублікували результати мета-аналізу, де дійшли висновку щодо відсутності переконливих доказів щодо переваг тестування біоплівки, але не планктонної культури *P. aeruginosa* на чутливість до антибіотиків [151]. Метод, безумовно, є перспективним, але на сьогодні потребує подальших досліджень, тому в нашій роботі ми спиралися на рекомендації надані EUCAST [148, 149, 150]. Вивчення профілю резистентності до антибіотиків проводили усім ізолятам патобіонтів зазвичай асоційованих з МВ згідно з рекомендаціями EUCAST.

Чутливість до більшості антибіотиків для *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* визначали диско-дифузійним методом [148, 149, 150]. Використані наступні диски з антибіотиками (Hi-Media, Індія):

- для тестування ізолятів *S. aureus*: бензилпеніцилін 1 ОД (P1), цефокситин 30 мкг (CX), норфлоксацин 10 мкг (NX), ципрофлоксацин 5 мкг (CIP), левофлоксацин 5 мкг (LE), моксіфлоксацин 5 мкг (MO), офлоксацин 5 мкг (OF), амікацин 30 мкг (AK), гентаміцин 10 мкг (GEN), тобраміцин 10 мкг (TOB), еритроміцин 15 мкг (E), кліндаміцин 2 мкг (CD), тетрациклін 30 мкг (TET), тайгециклін 15 мкг (TGC), міноциклін 30 мкг (MIN), лінезолід 10 мкг (LZ), ріфампіцин 5 мкг (RIF), хлорамфенікол 30 мкг (C), фузідієва кислота 10 мкг (FC), лефамулін 5 мкг (LFM), триметоприм/ сульфаметоксазол 25 мкг (COT);

- для тестування ізолятів *P. aeruginosa*: піперацилін 30 мкг (PI), піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг (PIT), тікарцилін 75 мкг (Ti), тікарцилін/ клавуланова кислота 75/10 мкг (TCC), цефепім 30 мкг (CPM), цефтазідім 10 мкг (CAZ), цефідерокол 30 мкг (FDC), цефтолозан/ тазобактам 30/10 мкг (C/T), імпенем 10 мкг (IMP), меропенем 10 мкг (MER), азтреонам 30 мкг (AT), ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, амікацин 30 мкг, тобраміцин 10 мкг;

- для тестування ізолятів *H. influenzae*: бензилпеніцилін 1 ОД, ампіцилін 2 мкг (AMP), амоксицилін/ клавуланова кислота 2/1 мкг (AMC), піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг, цефепім 30 мкг, цефіксим 5 мкг (CPM), цефотаксим 5 мкг (CTX), цефтолозан/ тазобактам 30/10 мкг, цефтріаксон 30 мкг (CTR), цефуроксім 30 мкг (СХМ), ертапенем 10 мкг (ERT), іміпенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, моксіфлоксацин 5 мкг, налідіксова кислота 30 мкг (NA), офлоксацин 5 мкг, тетрациклін 30 мкг, міноциклін 30 мкг, хлорамфенікол 30 мкг, триметоприм/ сульфаметоксазол 25 мкг:

- для тестування представників *Enterobacterales*: ампіцилін 10 мкг (AMP), ампіцилін/ сульбактам 10/10 мкг (A/S), амоксицилін/ клавуланова кислота 20/10 мкг, піперацилін 30 мкг, піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг, тікарцилін 75 мкг, тікарцилін/ клавуланова кислота 75/10 мкг, цефепім 30 мкг, цефтазідім 10 мкг, цефтріаксон 30 мкг, цефотаксим 5 мкг (CTX), цефуроксім 30 мкг, цефідерокол 30 мкг, цефтолозан/ тазобактам 30/10 мкг, іміпенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, азтреонам 30 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, моксіфлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, офлоксацин 5 мкг, амікацин 30 мкг, тобраміцин 10 мкг, гентаміцин 10 мкг.

Методом мікро-серійних розведень (bioMérieux, Франція) визначали чутливість до ванкоміцину у грам-позитивних коків, до колістину у грам-негативних паличок; до триметоприму/ сульфаметоксазолу, цефтазідиму, іміпенему, меропенему у *B. ceracia complex*; до амфотерицину В, воріконазолу та ітраконазолу грибів роду *Aspergillus*.

2.3.3 Визначення антагоністичних властивостей пробіотичних культур по відношенню до патобіонтів асоційованих з МВ

Для визначення антагоністичної активності суспензію аутосимбіонтів *Aerococcus spp.* або *B. clausii* (0,5 за McFarland) у дозі 0,1 мл висівали штрихом по діаметру (або у центрі) чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) петлею діаметром 3,5(0,5) мм. Посіви інкубували в термостаті при температурі 37(0,5)°C протягом ночі. Потім до культури, що виросла, перпендикулярним штрихом підсівали суспензії нічної культури ізолятів, отриманих від дітей з МВ (0,1 мл суспензії мікробів (0,5 за McFarland) в 0,85 % розчині натрію хлориду. Оптична

щільність вимірювалась для кожної культури окремо і була ідентичною до щільності аутоштаму *Aerococcus spp.* або *B. clausii*.

Визначення результатів дослідження проводили через 18 годин інкубування в термостаті при температурі 37(0,5)°C за розміром зон пригнічення росту тест-культур. Контролем росту тест-культур був їх паралельний висів на чашки з тим же поживним середовищем без дослідного ізоляту. Результати оцінювали за гальмуванням росту: зони затримки росту 0–5 мм (–) – неактивні, 6–10 мм (+) – помірно активні, 11–15 мм (++) – активні, більше 16 мм (+++) – високоактивні. Відповідно антагоністичну активність оцінювали як «відсутню», «слабку», «помірну» та «сильну». Отримані дані заносили в таблицю результатів [122].

2.3.4 Визначення адгезивних властивостей отриманих культур

S. aureus та *P. aeruginosa* є основними патогенами при МВ в дитячому віці. Адгезія мікроорганізмів є важливою стадією утворення біоплівки і характеризується прикріпленням вільно плаваючих планктонних клітин до біологічної чи абіотичної поверхні [74]. Для здатності отриманих ізолятів *S. aureus* та *P. aeruginosa* до адгезії застосували методику *Бриліса В. І.* в модифікації – замість еритроцитів людини I (0) Rh- використали комерційно доступні консервовані еритроцити барана. Мазки еритроцитів з адгезованими на них мікроорганізмами фарбували за Романовським-Гімзою.

Визначали такі показники:

- СПА – середній показник адгезії, тобто середня кількість мікроорганізмів, що прикріпилися до поверхні одного еритроцита при підрахунку не менше 25 еритроцитів, враховуючи не більше п'яти з них в одному полі зору;
- КУЕ – коефіцієнт участі еритроцитів, тобто відсоток еритроцитів, що мають на своїй поверхні адгезовані мікроорганізми;
- ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізму, середня кількість мікробних клітин на еритроциті, враховуючи тільки еритроцити, що беруть участь в адгезивному процесі. Формула для підрахунку ІАМ:

$$\text{ІАМ} = \frac{\text{СПА}}{\text{КУЕ}} * 100$$

(2.2)

Отримані дані заносили в таблицю результатів. Культури вважали неадгезивними при $IAM \leq 1,75$, низькоадгезивними – від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними – від 2,51 до 4,0, високоадгезивними – при IAM від 4,00 [122, 125].

2.3.5 Визначення біоплівкоутворюючих властивостей отриманих культур

Вивчення здатності клінічних ізолятів *S. aureus* та *P. aeruginosa* від дітей хворих на МВ формувати біоплівку вивчали в полімерних планшетах з наступним забарвленням 1%-розчином кристалічного фіолетового [152, 153, 154, 155]. Досліди проводили в аеробних умовах.

Нічну культуру *P. aeruginosa* або *S. aureus* в триптозно-соевому бульйоні (ТСБ) розвели 1:100 у свіжому середовищі. Аліквоти 100 мкл отриманої суспензії внесли в U-подібні лунки 96-лункового планшету. На 1 ізолят – 5 лунок. Засіяний планшет витримали протягом 24 год в термостаті при 37°C. Після інкубації з лунок відібрали культуру, планшет тричі промили стерильною дистильованою водою. Далі в кожен лунку внесли аліквоти 125 мкл 0,1% розчину кристалічного фіолетового та залишили 15 хв. за кімнатної температури. Після інкубації відібрали фарбник, планшет тричі промили стерильною дистильованою водою та висушили. Для оцінки біоплівкоутворення в кожен лунку планшету додали аліквоти 125 мкл 30% оцтової кислоти та витримали протягом 15 хв. за кімнатної температури. Аліквоти 125 мкл солюбізованого фарбника перенесли в новий планшет, що містить лунки з плоским дном. Оптичну щільність утвореної біоплівки визначали в мікропланшетному рідері при довжині хвилі 550 нм. Негативний контроль – 30% оцтова кислота [152, 153, 154, 155].

Для подальшої оцінки біоплівкоутворення використовували формулу:

$$\frac{M(O\check{C}d)}{M(O\check{C}k)} = \frac{M(OdO\check{C}d)}{M(OdO\check{C}k) + 3 * SD (OdO\check{C}k)},$$

де $O\Omega d$ – оптична щільність досліджу,
 $O\Omega k$ – оптична щільність контролю,
 $O d O\Omega d$ – одиниць оптичної щільності в дослідних лунках,
 $O d O\Omega k$ – одиниць оптичної щільності в контрольних лунках,
 M – середнє значення,
 SD – стандартне відхилення

Здатність ізоляту до продукції біоплівки визначали за наступним принципом (табл. 2.2):

Таблиця 2.2

Параметри оцінки ефективності біоплівкоутворення з використанням кристалічного фіолетового [153, 155]

Оптична щільність біоплівки	Продукція біоплівки	
$O\Omega k \leq \sim \leq O\Omega k$	Відсутня	-
$1 * O\Omega k < \sim \leq 2 * O\Omega k$	Слабка	+
$2 * O\Omega k < \sim \leq 4 * O\Omega k$	Помірна	++
$> 4 * O\Omega k$	Щільна	+++

$O\Omega k$ – оптична щільність контролю

Для візуалізації утворюваної біоплівки з нічної культури *S. aureus* або *P. aeruginosa* приготували суспензію в стерильному ізотонічному розчині *NaCl* у концентрації 10^9 КУО/мл. Аліквоти суспензії 0,3 мл внесли в лунки 6-луночного планшету, що містили 3 мл стерильного ТСБ та полістиролові скельця розміром 20 x 20 мм. Культивуацію здійснювали без перемішування протягом 6 год., 12 год., 24 год., 48 год., 96 год. По завершенні чергової експозиції полістиролові скельця обережно видаляли, промивали стерильним ізотонічним розчином *NaCl* та висушували при кімнатній температурі протягом. Після фіксації легким нагріванням покривні скельця фарбували сумішню водного розчину Конго червоного та полісорбат-80 (2:1) протягом 30 хв. Після промивання стерильним ізотонічним

розчином *NaCl* препарат дофарбовували 10% розчином карболового фуксину Циля протягом 6 хв. Після промивання, препарат висушували на повітрі та оглядали під світловим мікроскопом [156].

Для кількісної оцінки мікробного росту одночасно вилучені з поживного середовища полістиролові скельця після 3-кратного промивання переносили у скляні бюкси з 5 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію і піддавали обробці ультразвуком протягом 5-ми хвилин при частоті 35Hz в ультразвуковій ванні.

З утвореного внаслідок ультразвукової дезінтеграції біоплівки завису бактерій, готували послідовні десятикратні розведення і висівали на м'ясо-пептонний агар. Після добової інкубації у термостаті підраховували кількість колоній і перераховували на вміст бактеріальних клітин у одиниці об'єму завису у ІgKУО/мл [72, 157, 158].

2.3.6 Визначення рівня протимікробних пептидів в мокротинні.

Концентрацію АМП визначали в мокротинні дітей хворих на МВ. За необхідності, розведенні зразки зберігали протягом 1 тижня в холодильнику за температури -5°C . Безпосередньо перед початком дослідження зразки були доведені до кімнатної температури. Концентрації hBD-2 та hCAP-18/LL-37 були визначені методом Sandwich-ІФА, згідно з рекомендаціям виробника. В дослідженні використовувалися комерційно-доступні набори для визначення концентрацій hBD-2 та hCAP-18/LL-37 (Elabscience, США). Кожен тест-набір містить 96-лунковий планшет для досліджень та наступні реагенти: референс стандарту, концентровані біотинільовані антитіла, концентрат кон'юганту, розчинник для референсу стандарту та зразків, розчинник для біотинільованого виявлення антитіл, розчинник кон'юганту, концентрат буферного розчину, субстрат реагент, стоп-розчин).

Зразки були центрифуговані при 1000 обертах протягом 20 хвилин за температури $+5^{\circ}\text{C}$. Аліквотна кількість супернатату (100 мкл) вносили в лунки 96-лункового планшету та витримували протягом 90 хв. за температури 37°C . після відбору рідини, в лунки вносили робочий розчин біотинільованого антитіла, витримували протягом 60 хв. за температури 37°C . Після відбору рідини промивали

лунки тричі буферним розчином. Далі додавали аліквоти (100 мкл) робочого розчину кон'юганту, витримували протягом 30 хв. за температури 37°C. Після промивання лунок планшету додавали аліквоти субстрат реагенту (90 мкл) та витримували протягом 15 хв. за температури 37°C. далі відбирали рідину, додавали стоп-реагент та зчитували на ІФА-аналізаторі за довжини хвилі 450 нм [94, 95].

2.4 Методи статистичного аналізу отриманих результатів

Обробка отриманих результатів дослідження з використанням біостатистичних методів проводилася за допомогою програмних продуктів STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний № AGAR909E415822FA), Excel 2010 (Ліцензійний № 02260-018-0000106-48794) та включала описові та аналітичні статистичні методи [159, 160, 161].

Перевірка гіпотези про нормальність розподілу проводилася за критеріями Шапіро-Уїлка. В залежності від характеру розподілу використовували параметричні та непараметричні методи з визначенням кількості спостережень (n), середньої величини (M), стандартного відхилення (SD), стандартної похибки середньої (m), довірчого інтервалу (95% ДІ), медіани (Me) з міжквартильним інтервалом (25–75%) та 95% ДІ. Для узагальнення якісних даних використовувалися відносні величини (%) із 95% ДІ, розрахованим за методом Вальда.

Визначення вірогідності відмінностей середніх величин для незв'язаних груп проводилось за відповідними закону розподілу критеріями Стьюдента (t) і Манна-Уїтні (U); множинне порівняння незалежних вибірок – за непараметричним дисперсійним аналізом Краскела-Уолеса (H), залежних вибірок – за тестом ANOVA Фрідмана; відносних величин – за критерієм Хі-квадрат (χ^2) та двостороннім точним критерієм Фішера (ТКФ).

Для визначення зв'язку між безперервним кількісним показником та порядковим показником, та між двома кількісними показниками, що мали ненормальний розподіл, використовували ранговий кореляційний аналіз Спірмена (r_s). Напрямок кореляційного зв'язку оцінювався як прямий при позитивному значенні r та зворотній – при негативному значенні r_s . Зв'язок вважався сильним при значенні коефіцієнту кореляції $\geq 0,7$, середнім – 0,3-0,69, слабким – 0-0,29.

Критичним значенням p при перевірці статистичних гіпотез було прийнято $< 0,05$, тенденцію відзначали при $p < 0,10$.

РОЗДІЛ 3

МІКРОБНИЙ ПРОФІЛЬ РЕСПІРАТОРНОГО ТРАКТУ
ДІТЕЙ ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ

Значення мікробіологічного профілю дихальних шляхів в організації медичного супроводу при МВ важко переоцінити. Оцінка колонізаційного статусу має проводитися щоразу, коли пацієнт надходить до закладу охорони здоров'я [73, 130, 132, 134]. При чому обов'язковим є врахування і фенотипічних особливостей отриманих культур поряд з визначенням чутливості до хіміотерапевтичних засобів [130, 133, 134].

3.1 Стан коменсальної мікробіоти дихальних шляхів при муковісцидозі у дітей

Протягом 2019 – 2021 років було зібрано 315 проб з дихальних шляхів. В ході дослідження отримано 776 ізолятів від дітей з МВ. Усі відібрані зразки дали позитивний ріст, монокультура отримана в 2,5% випадків ($n = 8$). Поширеність отриманих ізолятів в середньому становила 2,5 на 1 пробу. Найбільша кількість відібраних проб взята від дітей віком від 6 до 12 років. В той же час, мікробне різноманіття у молодших дітей в порівнянні з підлітковим віком суттєво відрізнялося. Збіднене видове різноманіття коменсалів дихальних шляхів у дітей з МВ було характерним для усіх вікових груп, проте найбільш пошкоджений респіраторний мікробіом мали саме діти старших вікових груп.

В своїй більшості отримані ізоляти належали до двох філ. Найбільша частка ізолятів – 54,8% ($n = 425$) – належала до філи *Firmicutes*, яка була представлена родами *Staphylococcus* ($n = 270$), *Streptococcus* ($n = 72$), *Lactobacillus* ($n = 13$), *Aerococcus* ($n = 26$) та облігатними анаеробами *Peptostreptococcus spp.* ($n = 28$) та *Veilonella spp.* ($n = 16$).

Культуру *Staphylococcus spp.* отримали від усіх пацієнтів, задіяних у дослідженні. Видовий склад *Staphylococcus spp.*, виділених з дихальних шляхів,

включав *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lugdunensis* та *Staphylococcus saprophyticus*. Серед усіх представників роду *Staphylococcus* коагулазо-позитивні ізоляти, а саме *S. aureus*, становили 83,7%. Усі коагулазо-негативні види мали приблизно однакову частку, і складали лише близько 2-3%. Позитивними на *S. aureus* періодично були усі діти, культуру відновлено з 71,7% (n=226) відібраних проб. Присутність *S. aureus* у зразках негативно корелювала з коагулазо-негативними стафілококами – $\chi^2=95,48$ ($p<0,001$); $r_s = - 0,540$ ($p < 0,01$).

Серед ізолятів роду *Streptococcus* були ідентифіковані види *Streptococcus pyogenes* (n = 34), *Streptococcus pneumoniae* (n = 17) та представники групи *viridans* (n = 21), зокрема *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, а також *Streptococcus anginosus*. Позитивними на культуру *Streptococcus spp.* були 22,9% (n=72) відібраних проб. Серед каталаза-негативних коків, окрім роду *Streptococcus*, з дихальних шляхів дітей хворих на МВ також виділено 26 ізолятів ідентифікованих, як *A. viridans* – 8,3% відібраних проб. НФГНМО достовірно негативно впливали на присутність в зразках мікроорганізмів роду *Streptococcus* – $\chi^2=52,82$ ($p<0,001$); $r_s = - 0,402$ ($p < 0,01$) та роду коагулаза-негативних представників роду *Staphylococcus* – $\chi^2=30,460$ ($p<0,001$); $r_s = - 0,302$ ($p < 0,05$).

Peptostreptococcus spp. (n = 28) та *Veillonella spp.* (n = 16) сумарно становили 5,7% від загальної кількості ізолятів і були виділені з 14,0% відібраних проб. В нашому дослідженні облігатні анаероби виділені в меншій кількості, ніж зазвичай очікується [163, 164]. Навіть при дотриманні анаеробних умов, збагаченого поживного середовища та пролонгованої культивуації, ряд вимог могли бути ненавмисно не враховані. Проте також було показано, що погане різноманіття облігатних та факультативних анаеробів в дихальних шляхах при МВ є характеристикою патофізіологічних змін, пов'язаних з дисфункцією ТРБМ [165].

Філа *Proteobacteria* була надмірно представлена в дихальних шляхах та займала другу позицію серед ізолятів з 27,6% (n = 214); виділяли такі роди: *Neisseria spp.* (n = 9), *Achromobacter spp.* (n = 5), *Pseudomonas spp.* (n = 105), *Klebsiella spp.* (n

= 10), *Escherichia spp.* (n = 9), *Serratia spp.* (n = 2), *Moraxella spp.* (n = 4), *Haemophilus spp.* (n = 62) та *B. ceracia complex* (n = 7).

НФГНМО мають відомий негативний вплив на тривалість та якість життя хворих на МВ [72, 73]. Сумарно їх частка складала 15,6% ізолятів, культури були виділені з третини відібраних проб – 38,4%. Видовий склад роду *Pseudomonas* був представлений *P. aeruginosa* (n = 103), *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas putida*. Зазначимо, що виділення *P. fluorescence* та *P. putida* було епізодичним в окремих дітей, в кількості, що не була етіологічно значущою. Культура *P. aeruginosa* виділена з 32,7% (n=103) проб біологічного матеріалу. Поширеність *B. ceracia complex* в дитячому віці становила 2,22% (n = 7). Безумовно, такі результати вказують на важке порушення еубіозу дихальних шляхів при МВ вже в дитячому віці.

Ізоляти роду *Haemophilus* були виділені з 19,7%, їх частка займала 7,99% в загальній пропорції. Присутність роду *Haemophilus*, але на *S. aureus*, в зразках негативно корелювала з виділенням НФГНМО – $\chi^2=50,85$ ($p<0,05$); $r_s = - 0,394$ ($p < 0,05$)

Представники порядку *Enterobacterales* (n = 21), а саме *Klebsiella spp.*, *Escherichia spp.* та *Serratia spp.* становили 2,7% ізолятів та були виділені з 6,7% проб. Їх пристуність в пробах також негативно корелювала з пристуністю НФГНМО – $\chi^2=16,025$ ($p<0,001$).

Філа *Actinobacteria* була представлена *Corynebacterium spp.* і нараховувала 1,8% ізолятів (n = 14). Культури отримані з 4,4% відібраних проб. Відомо, що нетоксигенні *Corynebacterium spp.* є одними з основних комменсалів верхніх дихальних шляхів, проте в нашому дослідженні їх питома вага суттєво зменшена в порівнянні з загальною популяцією [5].

Філа *Bacteroidetes* нараховувала 2,4% ізолятів та була представлена родом *Prevotella spp.* (n = 19). Питома вага філи *Fusobacteria* становила 2,2% ізолятів (n = 17).

Виділені гриби належали до родів *Candida* (n = 70) та *Aspergillus* (n = 17), їх частка складала 11,2% серед усіх ізолятів. Культуру дріжджових грибів виділено з

22,2% проб. Рід *Candida* був представлений наступними видами в порядку зменшення їх питомої ваги – *C. albicans* (n = 61; 87% ізолятів роду), *C. dubliniensis* та *C. tropicalis*. І, хоча й роль даних мікроорганізмів в патогенезі МВ залишається обговорюваною, існують повідомлення, що *C. dubliniensis* може бути пов'язана з прогресуванням патології легень [165]. Позитивними на *Aspergillus spp.* були 5,4% проб, отриманих від 4 учасників дослідження. Видовий склад роду – *A. fumigatus* (n = 12; 71% ізолятів роду) та *A. flavus*. Присутність грибів роду *Aspergillus* у зразках була пов'язана з виділенням *P. aeruginosa* – $\chi^2=33,82$ ($p<0,001$).

Описані результати узагальнені та зображені на рис. 3.1.

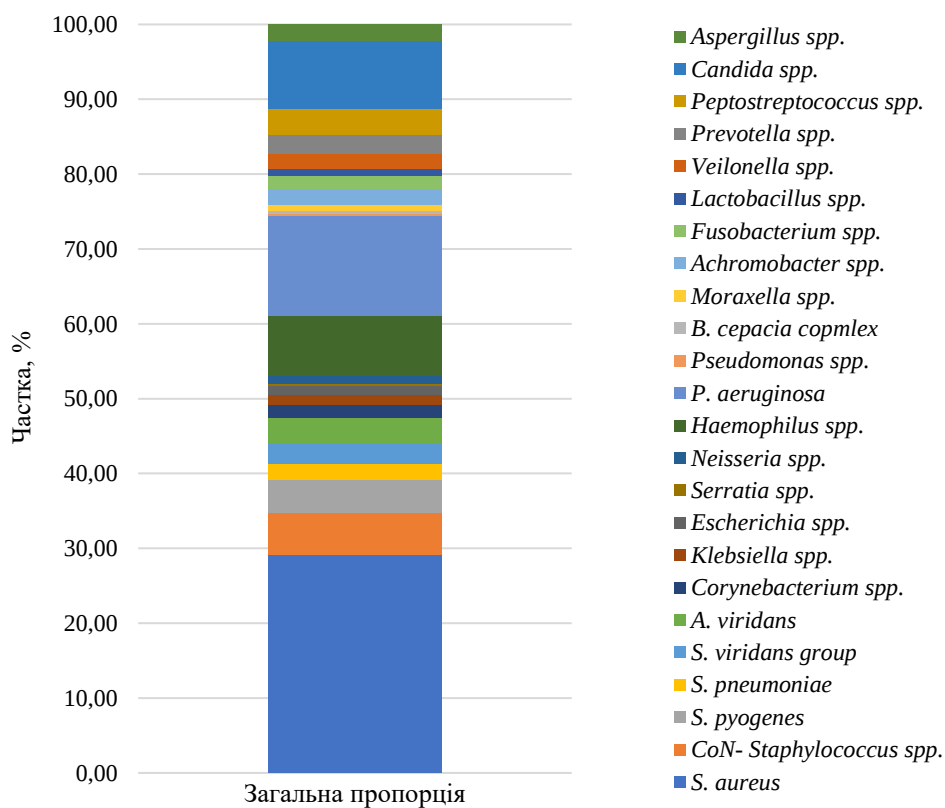


Рис. 3.1 Склад респіраторного мікробіому дітей хворих на МВ (частка, %; n = 776).

3.2. Вікові особливості мікробного профілю дихальних шляхів при муковісцидозі

Загальне мікробне навантаження суттєво не відрізнялося у всіх вікових групах і становило 10^5 - 10^{12} КУО/мл. В нашому дослідженні в дитячому віці основними патогенами були *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* та *A. fumigatus*, проте

відмічена достовірна різниця в якісному складі мікробіому різних вікових груп, $F = 2,83$; $p = 0,027$. Результати даного етапу дослідження зображені на рис. 3.2.

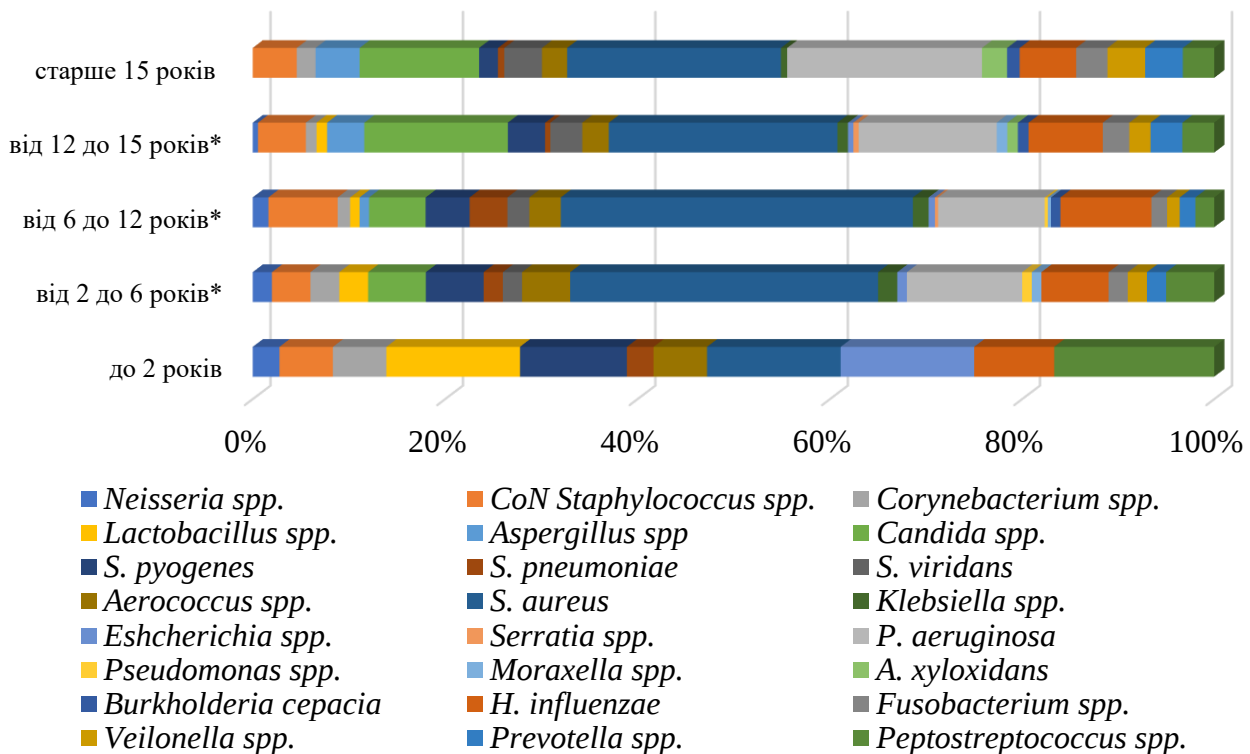


Рис. 3.2 Мікробний пейзаж дихальних шляхів у дітей з МВ різних вікових груп (частка, %; $n = 776$).

* $p < 0,01$ при порівннні мікробного спектру з попередньою віковою категорією

Від дітей віком до 2 років отримано 18 зразків з дихальних шляхів, які були позитивними на 36 унікальних ізоляти. Отримані культури належали до родів *Staphylococcus* ($n = 7$), *Streptococcus* ($n = 5$), *Lactobacillus* ($n = 5$) і *Corynebacterium* ($n = 2$). Незважаючи на порівняне різноманіття коменсальної мікробіоти в даній віковій категорії, треба зазначити, що в ранньому віці респіраторний мікробіом дітей з МВ вже був скомпрометований через присутність *S. aureus* ($n = 5$), родини *Enterobacteriaceae* ($n = 5$) та *H. influenzae* ($n = 3$). Найменша дитина задіяна в дослідженні віком 4 місяці мала позитивний результат на *S. aureus*, в тому числі при повторному обстеженні. Культура патогена отримана з респіраторних зразків в етіологічно значущій кількості 10^5 - 10^7 КУО/мл. Дані результати свідчать про ранню колонізацію дихальних шляхів агресивними збудниками при МВ. Загалом 26 дітей

(81,3%) мінімум тричі на рік мали позитивний результат бактеріологічного дослідження на *S. aureus*, що дає можливість говорити про хронічну інфекцію.

Від дітей віком від 2 до 6 років отримали 42 зразки з дихальних шляхів, позитивних на 100 унікальних ізолятів. Серед даної вікової категорії переважно виділяли роди *Staphylococcus* ($n = 36$), *Streptococcus* ($n = 10$), *Peptostreptococcus* ($n = 5$), але також *H. influenzae* ($n = 7$) та *P. aeruginosa* ($n = 12$). Мікробне різноманіття достовірно відрізнялося від попередньої вікової групи – $F=12,29$, $p < 0,001$.

Від дітей віком від 6 до 12 років отримали 306 унікальних ізоляти зі 148 зразків з дихальних шляхів. Серед даної вікової категорії переважно виділяли роди *Staphylococcus* ($n = 134$), *Pseudomonas* ($n = 35$), *Streptococcus* ($n = 33$), *Neisseria* ($n = 5$ з 9 отриманих в усьому дослідженні), а також *H. influenzae* ($n = 29$), *B. ceracia* ($n = 3$) та гриби ($n = 21$). Епізодично також отримували культури ентеробактерій, *M. catarrhalis*, а також *B. ceracia* ($n = 3$). Окрім того, мали зразки позитивні на *Enterobacteriaceae* ($n = 4$).

Зазначимо, що *Enterobacterales* були отримані переважно у віці до 6 років (коли тягар НФГНМО залишається незначним): до 28% проб у віковій групі до 2 років, близько 5% – з 2 до 6 років.

Діти старшого віку мали більшу різноманітність патобіонтів асоційованих з МВ. У віковій категорії від 12 до 15 років отримано 59 зразків, з яких виділено 181 унікальний ізолят. Мікробне різноманіття достовірно відрізнялося від попередньої вікової групи ($F = 4,92$, $p = 0,002$). Мікробіом дихальної системи був представлений *Staphylococcus spp.* ($n = 52$), *Pseudomonas spp.* ($n = 26$), *H. influenzae* ($n = 14$) та грибами родів *Candida* ($n = 27$) та *Aspergillus* ($n = 7$). В даній віковій категорії також мали зразки позитивні на *Achromobacter spp.*, *B. ceracia*, *M. catarrhalis*.

Сумарно коагулаза-негативні *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus*, *Aerococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* та *Neisseria spp.* становили 61,1% ізолятів у віці до 2 років, 48,0% – від 6 до 12 років і 35,3% – старше 15 років ($\chi^2 = 32,94$, $p < 0,05$).

Від дітей віком від 15 років отримали 48 зразків з дихальних шляхів; виділено 153 унікальних ізоляти. Загалом якісний склад мікробіоценозу був аналогічним до попередньої вікової категорії ($F=1,30$, $p > 0,05$) з подальшим прогресивним накопичення грам-негативних патобіонтів.

Поширеність за віком *S. aureus* в дослідженні наведена на рис. 3.3. Культуру отримали з 27,8% проб від дітей віком до 2 років (5 з 18 проб), проте з 2-річного віку з 76,2 – 70,8% з тенденцією до зменшення. Це може бути зумовлено прогресуючими патофізіологічними змінами в дихальних шляхах через дисфункцію ТРБМ та селекцією сприятливих умов для подальшої колонізації іншими прогностичними патогенами з більш розвиненими адаптивними та конкурентними властивостями.

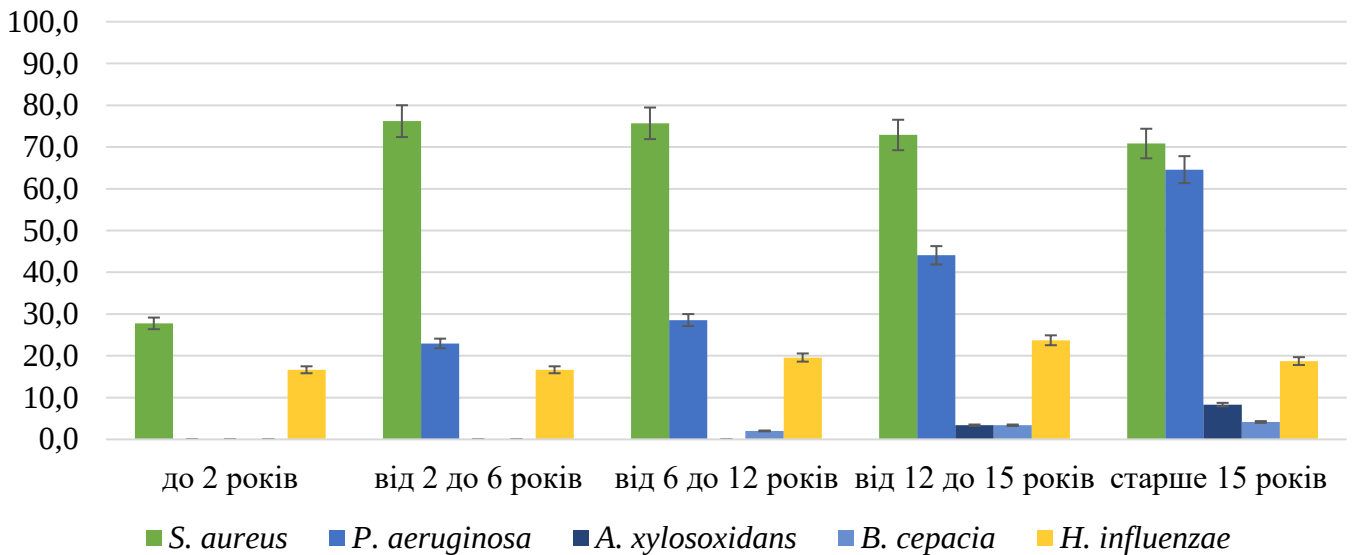


Рис. 3.3 Поширеність респіраторних патогенів при МВ у дітей різних вікових груп (%; $n = 315$).

В нашому дослідженні *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans* та *B. cepacia complex* починали свій вплив в ранньому дошкільному віці, проте роль даних збудників мала достовірну вік-залежну прогресію, $\chi^2 = 35,83$ ($p < 0,001$). При чому поширеність *P. aeruginosa* віці від 2 до 12 років складала 23,0-28,6%, а у віці старше 15 років – 64,9% ($r_s = 0,66$, $p < 0,001$).

Серед пацієнтів, задіяних в дослідженні, згідно з критеріями шкали *Leeds*, на кінець 2021 року було четверо дітей, які протягом року мали мінімум три послідовні

позитивні культури *P. aeruginosa*, виділені з дихальних шляхів, а отже, мали хронічну бронхолегеневу інфекцію. Ще від чотирьох дітей *P. aeruginosa* виділяли в 2020 році, проте в 2021 році – ні, тому таких пацієнтів віднесли до категорії «інфекція в минулому». Ще четверо дітей мали переміжну (інтермітуючу) інфекцію *P. aeruginosa*. Вік первинного інфікування *P. aeruginosa* становив 3 роки 9 місяців, що, беззаперечно, є дуже несприятливим прогностичним фактором.

Роль грибів у легеневій патології при дисфункції ТРБМ залишається обговорюваною, однак деякі дані показують, що наявність пліснявих грибів в дихальних шляхах також пов'язана з поганими клінічними результатами [50]. Гриби *Aspergillus spp.* виявляли періодично або послідовно, тому було визнано доцільним, розглянути їх, як патогени, та повідомити про результат. Цвілеві гриби виділено зі зразків від дітей вікової категорії старше 6 років, а поширеність патогену у віці 6-12 років становила 2,0%, 12-15 років – 11,9%, старше 15 років – 14,9% $r_s = 0,55$; $p < 0,05$. Серед усіх, 12,5% дітей ($n = 4$) були позитивні на плісняві гриби.

Поширеність коменсалів негативно корелювала з віком в нашому дослідженні. 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% ($\chi^2 = 76,57$; $p < 0,001$). Від дітей старшого віку в обмеженій кількості виділяли мікроорганізми родів *Aerococcus* та *Neisseria* (11,1% проти 8,3% та 5,6% проти 0,0% відповідно).

3.3 Особливості мікробного профілю дихальних шляхів відповідно до екологічної ніші

На наступному етапі дослідження наш інтерес був викликаний розумінням того, що мікроорганізми, які живуть у певній ніші, мають бути здатними протистояти відповідним різноманітним стресовим факторам. Різниця у вологості, концентрації солей та імунних факторів призводять до відмінностей у мікробному ландшафті верхніх і нижніх відділів дихальних шляхів [162, 163].

Для зручності розрухунків, ізоляти, отримані з назальних зразків, також були додані до загальної пропорції, тобто $n = 928$.

Провідними патогенами при дослідженні біологічного матеріалу з різних локусів дихальних шляхів були *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*. Проте

виявлено суттєві відмінності видового складу колонізаторів верхніх та нижніх дихальних шляхів ($\chi^2=107,22$; $p<0,001$).

Зі 182 назальних проб отримано 153 ізоляти. В нашому дослідженні мікробіом носової порожнини був збіднілим та представленим лише кількома таксономічними одиницями. З мазків з носоглотки переважно виділяли *Staphylococcus spp.* ($n = 114$), питома вага роду становила 79,1% від усіх ізолятів з даного локусу. Каталаза-негативні коки, властиві загальній популяції, зокрема *S. pneumoniae* та *A. viridans*, в нашому дослідженні виділялися епізодично; їх питома вага становила 1,96%. Аналогічно, рід *Corynebacterium* також давав скудний ріст, культуру отримано лише з 5,5% відібраних проб, питома вага ізолятів – 6,5% ($n = 10$). Серед культур з даної добре аерованої ніші не було облигатних анаеробів, а також представників *Enterobacterales*. Родове різноманіття зразків з порожнини носа відрізнялося від орофарингеальних мазків та мокротиння: $\chi^2= 93,40$; $p<0,01$ та $\chi^2=129,47$; $p<0,01$ відповідно.

В дослідженні отримано 182 орофарингеальних зразки та 133 проби мокротиння, з яких виділено 404 і 372 унікальних ізоляти відповідно. Орофарингеальні мазки містили супутню мікробіоту, зокрема коменсалів ротової порожнини – *S. oralis*, *S. mitis* та *S. sanguinis*, сумарно близько 2% ізолятів. Представники роду *Corynebacterium* також здебільшого виділяли при дослідженні орофарингеальних мазків (11 з 14 отриманих в дослідженні ізолятів), але в суттєво обмеженій кількості – поодинокі колонії. В той же час, на відміну від зразків з носоглотки, з орофарингеальних зразків було отримано *Pseudomonas spp.* ($n = 44$), *Haemophilus spp.* ($n = 28$), *Moraxella spp.* ($n = 3$), а також представників сімейства *Enterobacteriaceae* та *Serratia spp.* ($n = 9$; 42,9% від загальної кількості ізолятів порядку). В переважній більшості облигатні анаероби були виділені зі зразків мокротиння (60% від загальної кількості ізолятів анаеробів, $n = 48$), окрім того, рід *Prevotella spp.* майже не виділяли з орофарингеальних зразків. Родове різноманіття мокротиння та орофарингеальних зразків не відрізнялося ($\chi^2=15,44$; $p>0,05$). Порівняння мікробного різноманіття різних рівнів респіраторного тракту наведено на рис. 3.4.

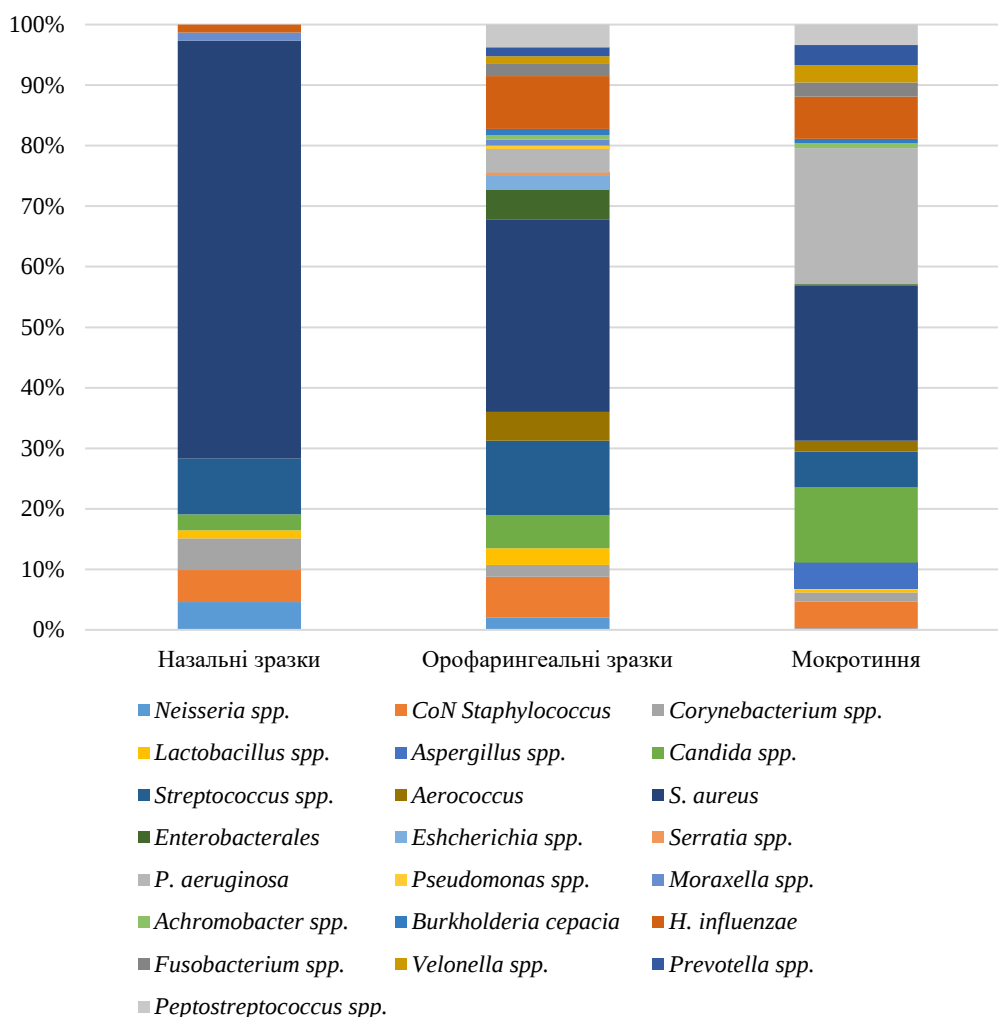


Рис. 3.4 Відмінності мікробного різноманіття верхніх та нижніх дихальних шляхів (частка, %; n = 928).

3.4 Узагальнення результатів дослідження

У дослідженні взяли участь 32 дитини віком від 2 місяців до 18 років, середній вік включення в дослідження становив 9,26 (0,35). Протягом дослідження було зібрано 315 проб з дихальних шляхів. Усі відібрані зразки дали позитивний ріст. Загальна поширеність отриманих ізолятів становила 2,5 на 1 визначення. Від дітей віком до 2 років отримано 18 зразків з дихальних шляхів, які були позитивними на 36 унікальних ізоляти; від 2 до 6 років – 42 зразки позитивних на 100 унікальних ізолятів; 6 до 12 років – 306 унікальних ізоляти зі 148 зразків. У віковій категорії від 12 до 15 років отримано 59 зразків, з яких виділено 181 унікальний ізолят, старше 15 років – 48 зразків з дихальних шляхів, позитивних на 153 унікальних ізоляти. В своїй більшості отримані ізоляти належали до двох філ – *Firmicutes* 54,8% (n = 425) та

Proteobacteria 27,6% ($n = 214$). Основними патогенами в дитячому віці були *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* та *A. fumigatus*, проте відмічена достовірна різниця в якісному складі мікробіому різних вікових груп, $F = 2,83$; $p = 0,027$. Загальне мікробне навантаження суттєво не відрізнялося у всіх вікових групах і становило 10^5 - 10^{12} КУО/мл.

Культуру *Staphylococcus spp.* отримали від усіх пацієнтів, задіяних у дослідженні. Частка *S. aureus* становила 83,7%, коагулазо-негативних видів – по 2-3%. Присутність *S. aureus* негативно корелювала з коагулазо-негативними стафілококами – $\chi^2 = 95,48$; $p < 0,001$. Поширеність *S. aureus* не корелювала з віком ($p > 0,05$). Культуру отримали з 27,8% проб від дітей віком до 2 років (5 з 18 проб), проте з 2-річного віку з 76,2 – 70,8% з тенденцією до зменшення. Це може бути зумовлено прогресуючими патофізіологічними змінами в дихальних шляхах через дисфункцію ТРБМ та селекцією сприятливих умов для подальшої колонізації іншими прогностичними патогенами з більш розвиненими адаптивними та конкурентними властивостями.

Сумарно коагулаза-негативні *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus*, *Aerococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* та *Neisseria spp.* становили 61,1% ізолятів у віці до 2 років, 48,0% – від 6 до 12 років і 35,3% – старше 15 років ($\chi^2 = 32,94$, $p < 0,05$). Поширеність також коменсалів негативно корелювала з віком в нашому дослідженні. 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% ($\chi^2 = 76,57$; $p < 0,001$). Від дітей старшого віку в обмеженій кількості виділяли мікроорганізми родів *Aerococcus* та *Neisseria* (11,1% проти 8,3% та 5,6% проти 0,0% відповідно). НФГНМО достовірно негативно впливали на присутність роду *Streptococcus* в зразках – $\chi^2 = 52,82$; $p < 0,001$.

НФГНМО мають відомий негативний вплив на тривалість та якість життя хворих на МВ [71, 72]. Сумарно їх частка складала 15,6% ізолятів, культури були виділені з третини відібраних проб. Поширеність НФГНМО прогресивно збільшувалася з віком. В дослідженні *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans* та *B. ceracia complex* починали свій вплив в ранньому дошкільному віці, проте роль

даних збудників мала достовірну вік-залежну прогресію, $\chi^2 = 35,83$, $p < 0,001$. При чому поширеність *P. aeruginosa* у віці від 2 до 12 років складала 23,0-28,6%, а у віці старше 15 років – 64,9% ($r_s = 0,66$; $p < 0,001$). Загалом культура *P. aeruginosa* виділена з 32,7% (n=103) проб біологічного матеріалу. Безумовно, такі результати вказують на важке порушення еубіозу дихальних шляхів при МВ вже в дитячому віці.

Присутність НФГНМО в зразках негативно корелювала з виділенням роду *Haemophilus* та порядку *Enterobacteriales* – $\chi^2=50,85$; $p<0,05$ та $\chi^2=16,03$; $p<0,001$ відповідно. Проте виділення грибів роду *Aspergillus* навпаки було пов'язане з появою *P. aeruginosa* – $\chi^2=33,82$; $p<0,001$. Роль грибів у легеневій патології при дисфункції ТРБМ залишається обговорюваною, однак деякі дані показують, що наявність пліснявих грибів в дихальних шляхах також пов'язана з поганими клінічними результатами [50].

На даному етапі, результати, отримані в нашому дослідженні з використанням розширеного культурального методу, були частково співставимі до описаними раніше. Вивчення мікробіоти нижніх дихальних шляхів з використанням 16S рРНК секвенування показало, що, незважаючи на значну міжіндивідуальну мінливість у структурі та складі мікробних спільнот, основу респіраторного мікробіому пацієнтів з МВ становлять роди *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Veillonella* та *Actinomyces*. Однак, при колонізації класичними збудниками, асоційованими з МВ, зокрема *Pseudomonas spp.*, *B. cepacia*, *Stenotrophomonas spp.* або *Achromobacter spp.*, вони, як правило, домінують в мікробному співтоваристві в окремих людей, що й було показано в нашій науково-дослідній роботі. Класичні збудники МВ частіше зустрічаються в старших вікових групах, а зменшення мікробного різноманіття корелює з прогресивним погіршенням легеневої функції та віком учасників досліджень [35, 36, 37]. В дослідженнях з застосуванням стандартного культурального методу, зазвичай, отримання культури облигатних анаеробів є викликом [37]. І в нашому дослідженні облигатні анаероби виділені в меншій кількості, ніж, зазвичай, очікується [163, 164]. В сучасних дослідженнях, заснованих

на секвенуванні 16S рРНК, підкреслено потенційну значимість анаеробів, особливо під час легневих загострень [36].

Тож, мікробіом дихальних шляхів у дитячому віці при МВ є пошкодженим. Для респіраторного тракту характерним є дефіцит коменсальних мікроорганізмів, які потенційно могли забезпечувати колонізаційну резистентність відносно патогенів, асоційованих з МВ. В той же час, функціонування дефіцитного ТРБМ створює передумови для колонізації мікроорганізмами, нетиповими для загальної популяції – НФГНМО – *P. aeruginosa*, *B. cepacia complex*, *A. xylosoxidans* та *Aspergillus spp.* тощо.

На наступному етапі дослідження наш інтерес був викликаний розумінням того, що мікроорганізми, які живуть у певній ніші, мають бути здатними протистояти відповідним різноманітним стресовим факторам. Різниця у вологості, концентрації солей та імунних факторів призводять до відмінностей у мікробному ландшафті верхніх і нижніх відділів дихальних шляхів [162, 163]. В дослідженні виявлено суттєві відмінності видового складу колонізаторів верхніх та нижніх дихальних шляхів ($\chi^2=107,22$; $p<0,001$).

Зі 182 назальних проб отримано 153 ізоляти. Мікробіом носової порожнини був збіднілим та представленим лише кількома таксономічними одиницями, зокрема *Staphylococcus spp.* ($n = 114$) – 79,1% та рід *Corynebacterium spp.* ($n = 10$) – 6,5%. Серед культур з даної добре аерованої ніші не було облигатних анаеробів, а також представників *Enterobacterales*. Мікробне навантаження орофарингеальних мазків та мокротиння було релевантним, $\chi^2=15,44$; $p>0,05$. На відміну від зразків з носоглотки, з орофарингеальних зразків та мокротиння виділяли *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella spp.*, *B. cepacia complex*, а також представників *Enterobacterales*.

Зазвичай для мікробіологічного моніторингу дихальних шляхів проводять відбір мокротиння або кашльових мазків. Забір аспірату або мазків з носоглотки можна розглянути при підозрі на інфекцію носових пазух. Такий консенсус пов'язаний з тим, що кашльові мазки та мокротиння мають достатню чутливість для виділення основних патогенів при МВ, тобто *P. aeruginosa* та *S. aureus* [36, 37]. В

той же, варто зазначити, що не можна не враховувати недостатню прогностичну цінність негативного результату [37, 127]. Аналогічно до наших результатів було показано, що зразки, що проходять верхні дихальні шляхи та порожнину рота, потенційно несуть супутню мікробіоту не пов'язану з захворюванням легень при МВ [37]. Але не можна виключати, що стан коменсалів є потенційним маркером або предиктором колонізації прогностично значущими патогенами, як було раніше показано відносно *Streptococcus* групи *milleri* та *P. aeruginosa* [35, 127]. Порівняльний аналіз мазків з порожнини носа, орофарингеальних мазків та мокротиння від 105 дорослих і дітей з МВ аналогічно до наших результатів показав, що назальні зразки мали низьку чутливість для виявлення патогенів нижніх дихальних шляхів у всіх трьох групах. В дослідженні також не було статистично значущих відмінностей між мікробним навантаженням орофарингеальних зразків та мокротиння [127].

Тож, варто зазначити, що використання розширеного культурального методу дає можливість виявити набагато складнішу мікробну різноманітність дихальних шляхів при МВ, ніж традиційна методика. Сучасні молекулярно-генетичні методи є високочутливими, але потребують значних витрат, обладнання та пов'язані зі складнощами в проведенні аналізу. Використання розширеного культурального методу в нашому дослідженні дозволило провести аналіз змін відносної кількості та структури мікробних спільнот в залежності від віку, рівня дихальних шляхів та присутності певного таксону, що, беззаперечно, свідчить про користь такого підходу до мікробіологічного моніторингу.

РОЗДІЛ 4

БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ,
ВИДІЛЕНИХ ВІД ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ

Мікробний пейзаж нижніх дихальних шляхів, беззаперечно, є тим прогностичним фактором, який визначає перспективу для тривалості та якості життя при МВ [36]. Поява особливих фенотипів зі здатністю до уникнення дії протимікробних агентів, ефекторів імунної системи та механічного кліренсу уможливорює колонізацію дихальних шляхів з терапевтичними невдачами та встановленням хронічної інфекції.

4.1 Мікробіологічні особливості основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом

В нашому дослідженні 88,9% виділених ізолятів *S. aureus* (n = 201 з 226) мали типові культуральні, морфологічні та біохімічні характеристики. Завдяки ліпохромному пігменту на жовточно-сольовому агарі з яєчною емульсією культури *S. aureus* утворювали мутні, круглі, рівні колонії кремового, жовтого або оранжевого кольору (рис. 4.1 і рис. 4.2). На поживному середовищі, яке містить кров, мікроорганізм зумовлював появу зони β -гемолізу.



Рис. 4.1 Типові колонії *S. aureus* з зонами лецитовітелазної активності на жовтково-сольовому агарі, 72 год. інкубації

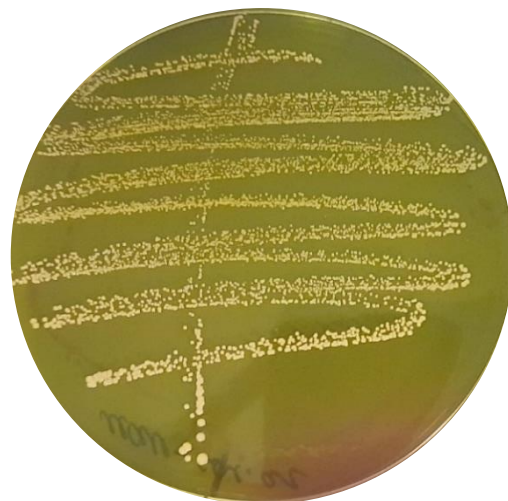


Рис. 4.2 Типові колонії *S. aureus* на манітол-сольовому агарі, 72 год. інкубації

Окрім культур *S. aureus* дикого типу, від дітей з МВ також виділяли ізоляти з ауксотрофним фенотипом – МКФ, їх частка становила відповідно 11,1%. Відновлення культури *S. aureus* з фенотипом МКФ викликало складнощі, адже через свої біологічні властивості їх ріст міг бути пригнічений дикими ізолятами або іншою коменсальною мікробіотою. Ауксотрофні культури в 84% випадків виділяли від дітей, які отримували лікування аміноглікозидами та/ або сульфаніламидами. Частота асоціацій МКФ *S. aureus* з *P. aeruginosa* складала 100%, і була достовірно вище, ніж в групі з диким фенотипом – 32,3% ($\chi^2=49,99$; $p<0,001$). МКФ *S. aureus* можна було відновити зі зразка з використанням збагаченого поживного середовища (кров'яний агар, шоколадний агар). Такі результати вказують на селекційний вплив згаданих факторів на появу дефектного фенотипу. *P. aeruginosa* впливає на *S. aureus* через продукцію 2-N-гептил-4-гідроксихіноліну-N-оксиду та сидерофорів, тривала експозиція яких зумовлює появу ауксотрофії до менадіону та геміну. Натомість ауксотрофія до тимідину, зазвичай, пов'язана з тривалим лікування сульфаніламидами, які конкурентно інгібують фермент, відповідальний за утворення дигідрофолієвої кислоти [35, 42, 44].

МКФ з'являлися на чашках Петрі через 48-72 год від початку інкубації в аеробних або мікроаерофільних умовах та мали вигляд дрібних (діаметр <1 мм),

непігментованих, негемолітичних колоній, іноді по типу «смаженої яєчні» (рис. 4.3 та рис. 4.4). За морфологією колоній МКФ *S. aureus* іноді можна було сплутати з негемолітичними стрептококами.



Рис. 4.3. Змішана культура *P. aeruginosa* та МКФ *S. aureus* на шоколадному агарі, 72 год культивування



Рис. 4.4. Змішана культура. Непігментована мукоїдна *P. aeruginosa*, β -гемолітичні стрептококи та МКФ *S. aureus* з частковою реверсією на кров'яному агарі, 48 год культивування

Реверсія МКФ *S. aureus* в дикий фенотип відбувалася після пересіву та культивування в анаеробних умовах та/або при кімнатній температурі (час-залежна стабільність) (рис. 4.4, 4.5).



Рис. 4.5. Культура дикого фенотипу та МКФ *S. aureus* на кров'яному агарі, 72 год культивування

До рис. 4.5. Час-залежна стабільність ауксотрофних колоній *S. aureus*. Культуру МКФ *S. aureus* культивували протягом 24 год при 37°C. Далі з поверхні агару зняли кілька колоній МКФ, а чашку Петрі залишити за кімнатної температури при світлі. Через 24 год проростали нові колонії з диким фенотипом (жовта смуга). Нові колонії дикого типу також проростали протягом кількох діб серед колоній МКФ, ймовірно, через деякі компенсаторні мутації. Ревертовані клітини, ймовірно, можуть використовувати також продукти, синтезовані ізолятами МКФ (наприклад, вуглекислий газ, ферменти).

При мікроскопічному дослідженні МКФ *S. aureus* мали типове для грам-позитивних мікроорганізмів забарвлення, проте зовнішній вигляд нагадував *Micrococcus*. Профіль біохімічної активності: каталазний тест позитивний, оксидазний тест негативний, відтермінування до 48-72 год позитивного тесту на коагулазу, тести на ферментацію глюкози та фруктози – позитивні, маніту – негативний.

В нашому дослідженні також прослідковувалася деяка міжмікробна взаємодія. Характерною була відсутність *S. aureus* в присутності коагулазо-негативних представників роду. Вірогідно коагулазо-негативні *Staphylococcus spp.* мають супресивний вплив на даний патобіонт. Проте, з іншого боку, мають також враховуватися локальний імунний профіль, зокрема сіль-залежна активність ряду АМП. І тим не менш, в нашому дослідженні *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* та *S. haemolyticus* захищали від колонізації *S. aureus* або суттєво обмежували ріст мікроорганізму ($\chi^2 = 88,56$, $p < 0,001$).

Усі ізоляти роду *Pseudomonas* мали типові біохімічні властивості з інертністю до більшості цукрів; культури *P. aeruginosa* ($n = 103$) показували характерну ациламідазну активність. На цетримідному агарі з гліцерином та агарі Ендо мікроорганізм утворював три основних типи колоній – мукоїдні (рис. 4.6, 4.7, 4.8, 4.9), великі випуклі блискучі (рис. 4.3, 4.9) та невеликих розмірів неправильної форми – МКФ (рис. 4.10). Частка мукоїдів становила 27,2% ($n = 28$) від усіх ізолятів, МКФ – 5,8% ($n = 6$). Варто зазначити, що агар Ендо мав більшу результативність з відновлення *P. aeruginosa* з клінічного зразка в порівнянні з селективним цетримідним агаром – 68,0% ($n = 71$).



Рис. 4.6 Мукоїдна культура *P. aeruginosa* з продукцією піоціаніну на цетримідному агарі з гліцерином, 48 год. Рис. 4.7 Мукоїдна лактозо-негативна культура *P. aeruginosa* без продукції пігменту на середовищі Ендо, 24 год.



Рис. 4.8 Мукоїдна культура *P. aeruginosa* без продукції пігменту на цетримідному агарі з гліцерином, 48 год.

До рис. 4.6, 4.7, 4.8. Представлені типові мукоїдні ізоляти *P. aeruginosa* отримані від дітей хворих на муковісцидоз. Протягом кількох найближчих днів зображена біологічна маса заповнить всю чашку Петрі та капатиме на кришку (при перевернутому до гори зберіганні).

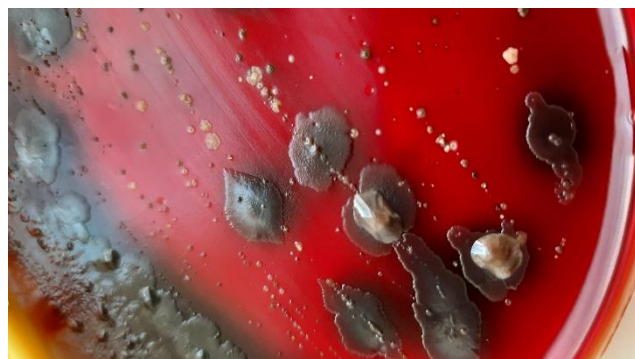


Рис. 4.9. Культура *P. aeruginosa* на кров'яному агарі, 24 год

До рис. 4.9. Звертає на себе увагу присутність двох фенотипів – мукоїдного зі втратою характерного пігменту (колонії сіро-жовті, забарвлені слабо) та зі слизистим виглядом, а також немуккоїдного – темно-зелені плоскі або з припіднятим центром розлогі колонії



Рис. 4.10 Культура МКФ *P. aeruginosa* на середовищі Ендо, 48 год

Мукоїдні ізоляти на кров'яному агарі проявляли α - та β -гемолітичну активність. Проте для більшості була характерною втрата продукції пігменту (рис. 4.8). Зазвичай мукоїдний морфотип був асоційований з хронічною інфекцією.

МКФ *P. aeruginosa* з'являлися на чашках Петрі через 48 год від початку інкубації в аеробних та мали вигляд дрібних (діаметр <1 мм) колоній неправильної форми (рис. 14). МКФ *P. aeruginosa* були непігментованими і не проявляли гемолітичної активності, на відміну від мукоїдного та дикого морфотипів. Тестування на рухливість – плавна посмикувальна моторика. Показники біохімічної активності були традиційними.

Аналогічно до мукоїдів, МКФ *P. aeruginosa* є ознакою хронічної інфекції. Відомо, що даний морфотип є високоадгезивним та пов'язаний з прогресивним погіршення функції зовнішнього дихання [45].

В нашому дослідженні були деякі ізоляти *P. aeruginosa*, виділені від кількох дітей з МВ, які мали характерні фенотипічні особливості (форма колоній та характер росту, продукований пігмент, чутливість до антибіотиків). Перш за все, мукоїдні ізоляти виділяли від дітей з хронічною та переміжною інфекцією *P. aeruginosa*. Важливою особливістю чотирьох ізолятів *P. aeruginosa*, послідовно отриманих від дівчинки 7 років 4 місяці, була поява феномену «веселкового лізису», який проявлявся появою на поверхні колоній плівки, що переливається у відбитому світлі різними кольорами веселки. Даний феномен обумовлений спонтанною дією бактеріофага і є характерним для *P. aeruginosa*.

Наступною особливістю *P. aeruginosa* була здатність до продукції пігментів, які є одним з факторів вірулентності [39]. Колонії, які мали флуоресціюючий зелений, жовто-зелений або коричневий колір, вважалися продуцентами піовердіну, темно-зелені або сині колонії – піоціаніну (рис. 4.11, 4.12). Ізоляти, отримані від дітей з муковісцидозом, в нашому дослідженні секретували піовердін в 59,4% випадків, піоціанін – 21,2%, жоден з пігментів – 19,5%.

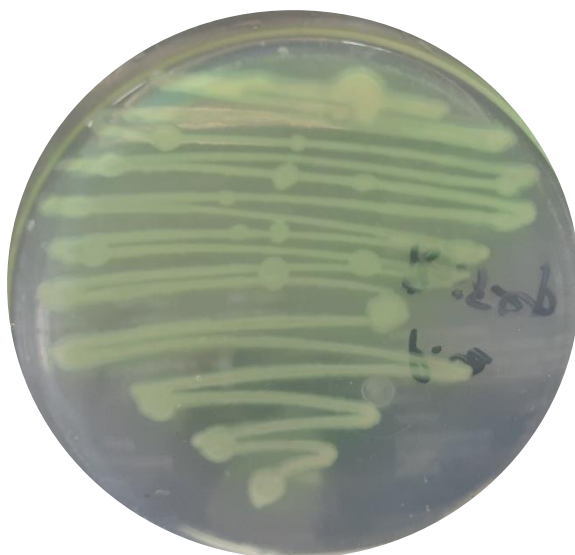


Рис. 4.11. Немукоїдна культура *P. aeruginosa* на цетримідному агарі з гліцерином, 24 год; показано продукцію пігменту піовердіну

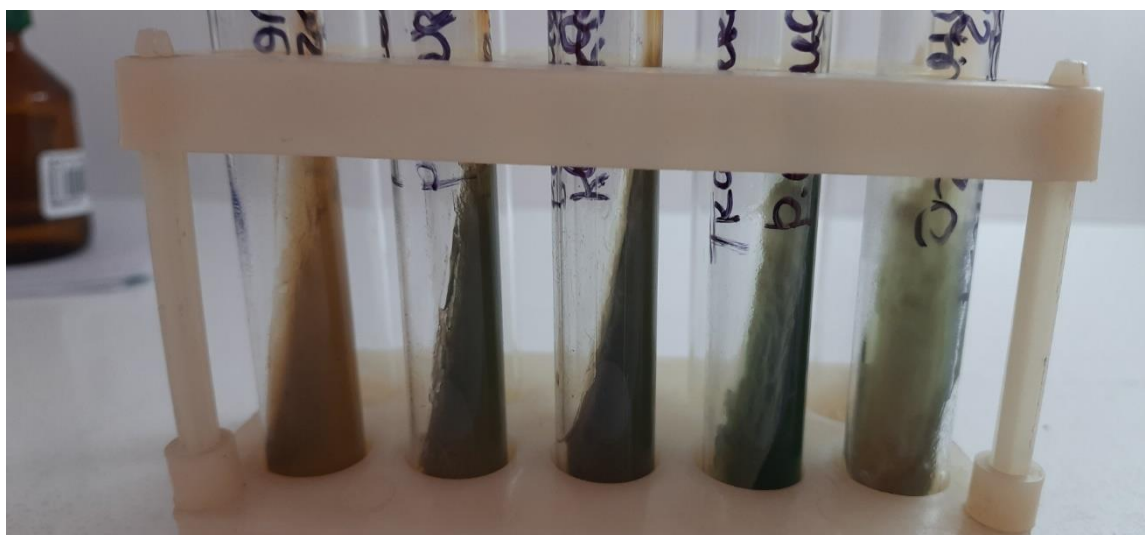


Рис. 4.12 Ріст культур *P. aeruginosa* на скошеному агарі, 72 год. Показано продукцію піовердіну (перша та остання пробірка) та піоціаніну (пробірка 2, 3, 4).

Не можемо не відзначити той факт, що в нашому дослідженні інфекція *P. aeruginosa* була асоційована з виділенням грибів. З одного боку тривала та рекурентна антибактеріальна терапія сприяє активації грибів, проте з іншого – *P. aeruginosa* має інгібіторний вплив на такі мікроорганізми через продукцію сидерофорів та контроль над залізом в мікросередовищі. Тим не менш, гриби мають свої механізми уникнення згубної дії бактерії [48]. В нашому дослідженні вірогідність виділення культури *Aspergillus spp.* була пов'язана з присутністю *P. aeruginosa* в дихальних шляхах - $\chi^2 = 32,82$; $p < 0,001$. Зазначимо, що ізоляти *Aspergillus spp.* виділяли саме в асоціації з мукоїдними колоніями *P. aeruginosa*. Звичайно, даний факт є дискусійним та потребує подальших досліджень, в тому числі імунологічних, проте вартий уваги.

Стосовно *Candida spp.* ситуація була аналогічною, і ми також знайшли статистично достовірний вплив *P. aeruginosa* на колонізацію грибами, $\chi^2 = 26,07$; $p < 0,001$).

Відновлення культури *B. cereus complex*, на відміну від її ідентифікації, не викликало складнощів (рис. 4.13). Хороші ростові показники були отримані на агарі Ендо, кров'яному агарі та цетримідному агарі з гліцерином, проте для селективного виділення використовували BCSCA, що містить колістин. Засіяні чашки Петрі витримували протягом ночі в термостаті за температури 35°C, а далі залишали за кімнатної температури до 72 год. Для даного мікроорганізму характерним був відносно повільний ріст з появою колоній після 48-72 год інкубації. На середовищі BCSCA мікроорганізм продукував розлогі жовтушні колонії, оточені жовтим ареолам. На середовищі Ендо мікроорганізм продукував слизисті розлогі лактозо-позитивні колонії.



Рис. 4.13 Культура *B. cerasia complex* на шоколадному агарі, 72 год культивування при кімнатній температурі

Біохімічна ідентифікація проведена за показниками наведеними в табл. 4.1 та на рис. 4.14. Згідно з книгою кодів для тест-набору, точність ідентифікації коливалася в межах 61,27 – 100,00%. Перед повідомленням результату були проведені повторні підтверджуючі тести.

Таблиця 4.1

Спектр біохімічної активності ізолятів *B. cerasia complex*, виділених з дихальних шляхів дітей, хворих на муковісцидоз

Біохімічний показник	Типова реакція	Біохімічний показник	Типова реакція	Біохімічний показник	Типова реакція
Оксидаза	+				
Уреаза	-	Лактоза	+	Галактоза	+
Аргінін	-	Манітол	d	Мальтоза	+
Орнітин	в	Трегалоза	+	Целобіоза	+
Лізин	в	Ксилоза	d	Сахароза	в
Ацетамід	в	Арабіноза	d	Інозитол	в
β-глюкозидаза	в	α-галактозидаза	-	γ-глутамілтрансфераза	+
N-ацетил-β-D-глюкозамінідаза	в	β-галактозидаза	+	Фосфатаза	+
Цитрат Сіммонса	+	Малонат	+	Ескулін	-

в – *варіабельна реакція*

+

– *негативна реакція*



Рис. 4.14 Біохімічна ідентифікація *B. cerasia complex* з використанням мікропланшетів, 24 год. Якість ідентифікації – чудова; код 164640473 – 95,03%.

Роль представників сімейства *Enterobacteriaceae* в патогенезі МВ залишається обговорюваною і, скоріше за все, не є прогностично значущою. Проте не можна виключити вірогідну здатність згаданої групи мікроорганізмів викликати гострі процеси в дихальних шляхах [168]. Окрім того, існують свідчення, що інфікування ентеробактеріями можливо у віці до 5 років і може бути пов'язане з ризиком інфікування *P. aeruginosa* у більш пізньому віці [169]. Серед ізолятів, отриманих від дітей, хворих на МВ, не було культур *Enterobacterales* з атиповими властивостями. Для *E. coli* характерною була поява типових лактозо-позитивних колоній на агарі Ендо після 24 год інкубації. Культури *K. pneumoniae* були лактозо-негативними на агарі Ендо після 24 год культивування без появи гіпермукоїдного фенотипу.

Цвілеві гриби переважно не є збудниками захворювань у людей. Проте при МВ було доведено роль родів *Aspergillus* та *Scedosporium* в патогенезі захворювання легень [28, 50, 134]. Для *A. fumigatus* характерною була поява повільно-зростаючих, розгалужених пухнастих колоній на агарі Сабуро після 72-96 год культивування в термостаті при температурі 25-30°C (рис. 4.15). Повітряна частина грибниці спочатку була білого кольору, проте, по мірі спороутворення набувала темно-оливково-сірого забарвлення. Мікроскопічна картина: конідіальні головки колонкоподібні, 50 – 400 мкм; конідієносці відходять прямо від гіф у вигляді коротких гілок 500 x 5 – 8 мкм, звичайно розширюються до верхівки; конідії кулеподібні, 2,5 – 3 мкм, у масі темно-зелені, гладкі або шорсткі.

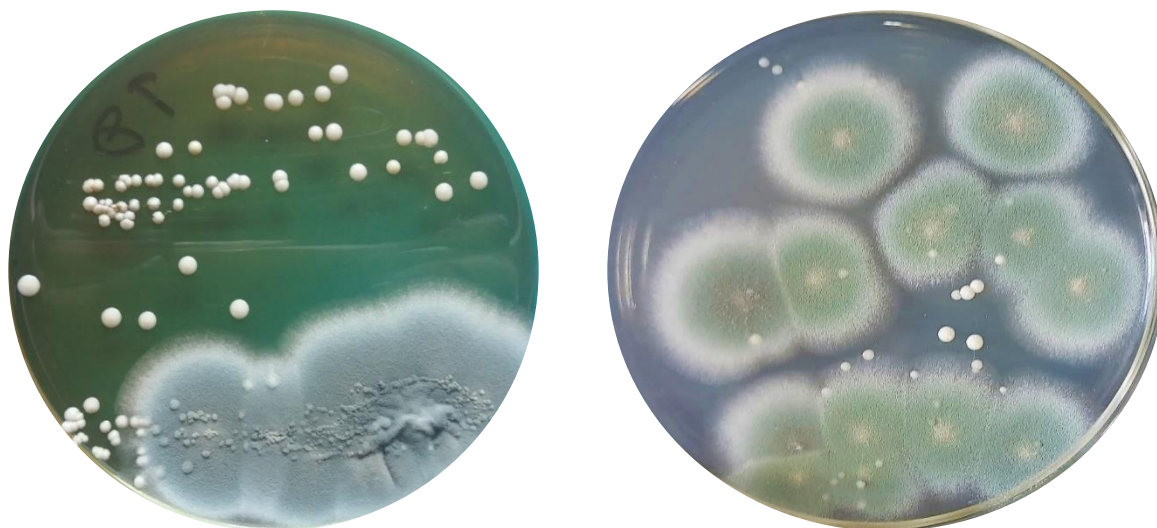


Рис. 4.15 Змішана культура *A. fumigatus* та *C. albicans* отримана з мокротиння дитини хворої на МВ. Агар Сабуро з гентаміцином, 96 год культивування

Для *A. flavus* також була характерною поява повільно-зростаючих колоній після 72-96 год культивування в термостаті при температурі 25-30°C. Морфологія колоній – широкорозгалужені складчасті з жовтушним забарвленням (рис. 4.16). Під мікроскопом конідіальні головки змінювали забарвлення від яскраво-жовтого до темно-зеленого і мали 300 – 600 мкм в діаметрі, розділялися на декілька колонок. Конідієносці безбарвні, 1 - 2,5 мм в висоту. Конідії кулеподібні, 3 – 6 мкм в діаметрі, іноді еліптичні, 4 - 5 x 3,5 - 4,5 мкм, нечітко шорсткі.



Рис. 4.16 Культура *A. flavus* отримана з мокротиння дитини хворої на МВ. Агар Сабуро, 72 год культивування

4.2 Профіль хіміотерапевтичної чутливості основних патобіонтів, асоційованих з муковісцидозом

Антимікробна терапія є есенціальною в комплексному лікуванні муковісцидозу. Тривалі та рекурентні курси протимікробної терапії, відвідування закладів охорони здоров'я селективно впливають на розвиток лікарської стійкості. Згідно з рекомендаціями РПСТМВ, профіль чутливості основних патогенів до антибіотиків має визначатися щонайменше раз на рік [130, 131, 132, 133]. Згідно з існуючими українськими рекомендаціями, таке дослідження має бути проведене щоразу [9].

4.2.1 Профіль чутливості *Staphylococcus aureus*

Визначення чутливості ізолятів *S. aureus* до протимікробних засобів проведено в 100% випадків. Усі ізоляти фенотипово протестовано на стійкість до метициліну. Відомо, що тест з диском цефоксітину 30 мкг є надійним предиктором існування генів *mecA* або *mecC*, а скринінг на BORSA (гранична резистентність до оксациліну *S. aureus*) через МІК оксациліну не рекомендований комітетом EUCAST до рутинного використання [148, 150]. Тож з 226 ізолятів *S. aureus* резистентними до цефоксітину, тобто MRSA за фенотипом, були 12 культур, з них 5 послідовно отримані від 1 дитини віком 9 років 3 місяці, від якої виділяли в тому числі й МКФ; середній діаметр зони затримки росту – 10,8 (1,1) мм. Такі ізоляти показували резистентність й до еритроміцину, гентаміцину, норфлуксацину та ципрофлоксацину, хлорамфеніколу та триметоприм-сульфаметоксазолу.

Результати визначення хіміотерапевтичної чутливості *S. aureus* узагальнені на рис. 4.17 та 4.18 Найкращі результати зареєстровано для аміноглікозидів III покоління, фторхінолонів III покоління, лінезоліду, ріфампіцину та тетрациклінів.

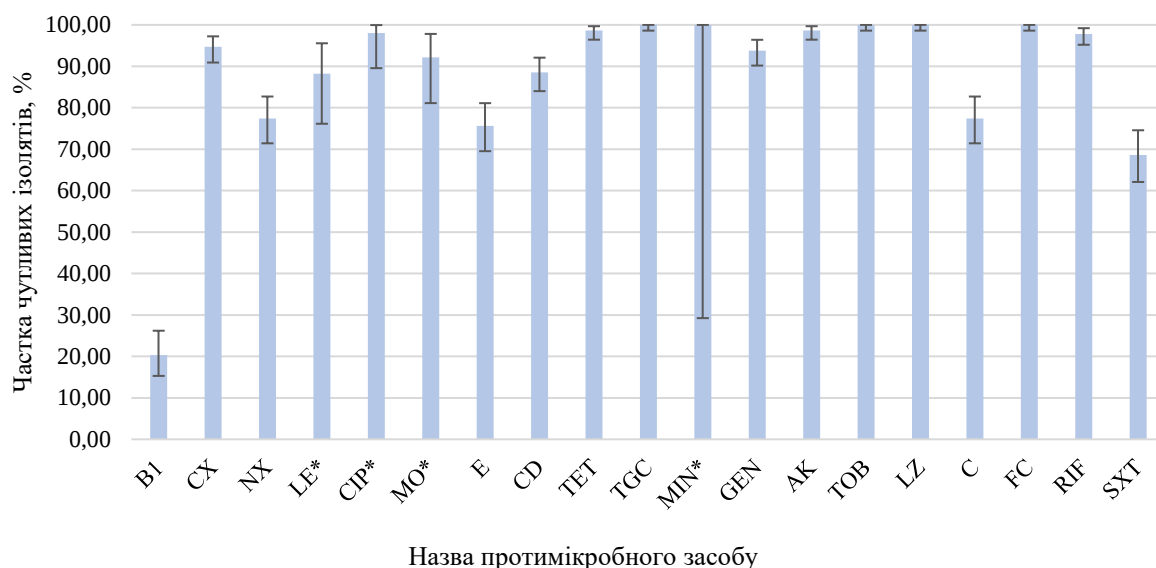


Рис. 4.17 Частка чутливих ізолятів *S. aureus* при визначенні хіміотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 226; % (95%ДІ))

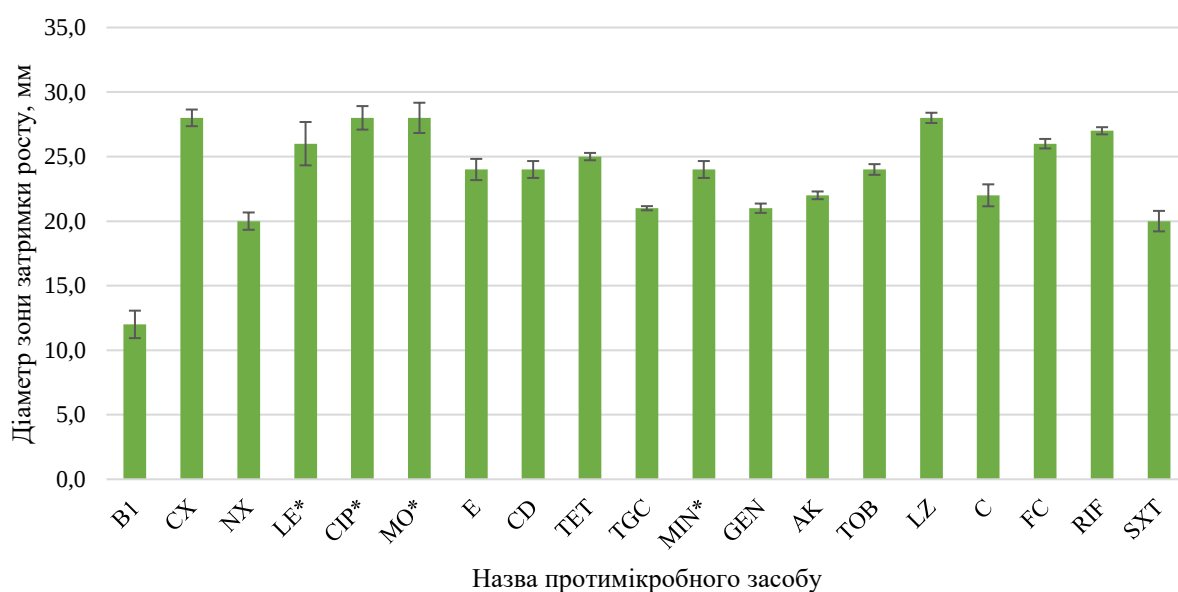


Рис. 18 Середні значення (Me (95%ДІ)) показників діаметру зони затримки росту *S. aureus* при дослідженні чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом

Примітка. значення стосуються зони затримки росту лише тих ізолятів, які виявилися стійкими до відповідного скринінгу

В нашому дослідженні чутливими до усіх β -лактамів (в тому числі незахищених пеніцилінів) були лише 20,4% (95%ДІ 53,7-79,6) ізолятів *S. aureus*. Водночас, варто пам'ятати, що і в такому разі очікувана ефективність пероральних препаратів *in vivo* залишається сумнівною (рис. 4.19). Ті ізоляти *S. aureus*, що

показали резистентність до бензилпеніциліну, що, як відомо, є наслідком здатності до продукції пеніциліназ, були також стійкими до феносциметилпеніциліну, ампіциліну, амоксициліну, піперациліну та тікарциліну.

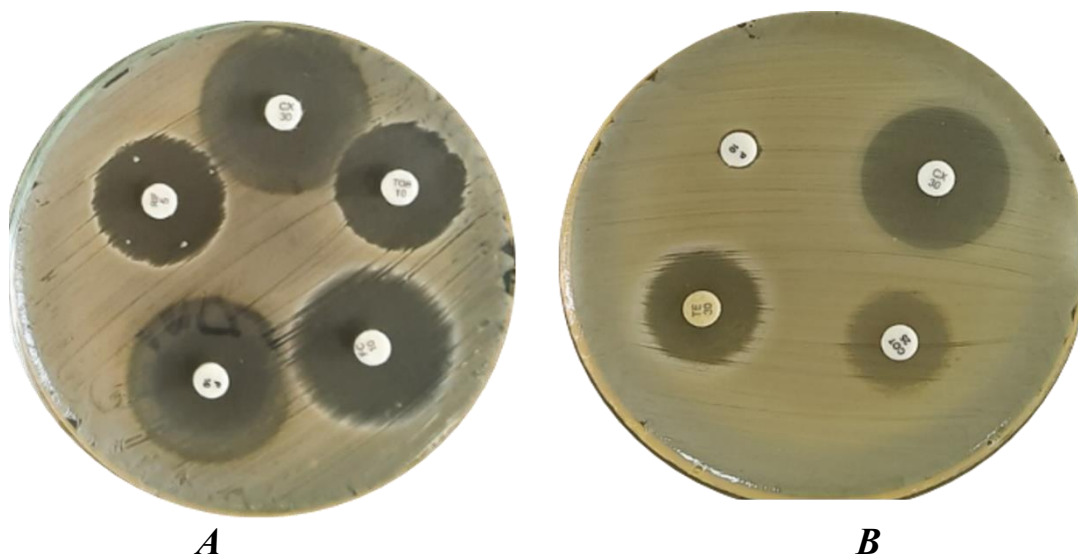


Рис. 4.19 Визначення чутливості ізолятів *S. aureus* до антибіотиків диск-дифузійним методом. Агар Мюллера-Хінтона, 18 год

А: ізолят чутливий до бензилпеніциліну 1 МО (розсіяна зона затримки росту) та цефоксітину 30 мкг;

В: ізолят стійкий до бензилпеніциліну 1 МО (зона затримки росту відсутня) та чутливий до цефоксітину 30 мкг.

Чутливість до цефоксітину показали 94,7% (95%ДІ 90,9-97,2) ізолятів. Такі культури були сприйнятливими до пеніцилінів в комбінації з інгібіторами бета-лактамаз (ампіцилін/ сульбактам, амоксицилін/ клавуланова кислота, піперацилін/ тазобактам, тікарцилін/клавуланова кислота), ізоксазоліпеніцилінів (оксацилін, флоксацилін, диклоксацилін та флуклоксацилін) та нафциліну, більшості цефалоспоринів (цефаклор, цефадроксіл, цефалексін, цефазолін, цефепім, цефотаксім, цефоксітін, цефподоксім, цефтріаксону, цефподоксім) та карбапенемів (ертапенем, іміпенем, меропенем, меропенем-ваборбактам).

Чутливість до скринінгу з еритроміцином становила 75,7% (95%ДІ 69,5-81,1), такі ізоляти були сприйнятливими безпосередньо до еритроміцину, азитроміцину, кларитроміцину та рокситроміцину. Резистентні ізоляти виявилися чутливими до кліндаміцину, появу D-феномену реєстрували у двох дітей ($n = 6$), рис. 4.20.



Рис. 4.20 Визначення чутливості *S. aureus* до антибіотиків диск-дифузійним методом, D-феномен – індукцйбельна стійкість до кліндаміцину в присутності макролідів. Агар Мюллера-Хінтона, 18 год

Чутливість *S. aureus* до скринінгу з норфлоксацином становила 77,7% (95%ДІ 71,4-82,7), резистентні ізоляти протестовані на сприйнятливості до ципрофлоксацину, левофлоксацину та моксіфлоксацину та показали позитивний результат в переважній більшості випадків. Медіана зона затримки росту становила 20 мм (95%ДІ 19,3-20,7).

Чутливість до скринінгу з тетрацикліном становила 98,7% (95%ДІ 96,4-99,7), такі ізоляти були сприйнятливими безпосередньо до тетрацикліну, а також доксицикліну та міноцикліну. Медіана зона затримки росту становила 25 мм (95%ДІ 24,7-25,3). Ізолят, що показав резистентність до тетрацикліну, виявився чутливим до міноцикліну. Відомо, що штами резистентні до тайгецикліну зустрічаються вкрай зрідка, і в нашому дослідженні таких ізолятів не було.

Визначення чутливості до ванкоміцину проводили з визначенням МІК – серед протестованих ізолятів резистентних не було, тобто $\text{МІК} \leq 2 \text{ мг/л}$.

Розуміємо, що стандартні методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків *in vitro* були розроблені і схвалені для тестування швидкозростаючих бактерій, а статистична обробка даних потребує достатньої вибірки, то, оскільки МКФ мають змінені властивості, а вибірка складає лише 26 ізолятів, отримані результати слід інтерпретувати з обережністю [148, 150].

При порівнянні хіміотерапевтичної чутливості *S. aureus* з диким фенотипом та ауксотрофною модифікацією отримано подібні результати, проте спостерігалася тенденція до наростання резистентності до β -лактамів та гентаміцину. Медіана зони затримки росту при визначенні чутливості до цефоксітину у ізолятів зі звичайним фенотипом (n=226) склала 28 (95%ДІ 27,4-28,6) мм, а у ізолятів зі зміненим фенотипом (n=26) – 23 (95%ДІ 10-28) мм. Різниця між медіанними значеннями складає 5 (95%ДІ 2-9) мм і була статистично значущою ($p=0,001$ за критерієм Манна-Уїтні). Подібні результати мали відносно чутливості до гентаміцину – різниця між медіанними значеннями склала 4 (95%ДІ 2-7) мм і також була статистично значущою ($p<0,001$ за критерієм Манна-Уїтні). Проте, достовірної різниці у частоті виділення чутливих ізолятів між обома фенотипами для цефоксітину та гентаміцину не було: $\chi^2=1,75$; $p=0,370$ та $\chi^2=2,65$; $p=0,207$ відповідно.

При порівнянні діаметрів зон затримки росту та частоти виділення чутливих ізолятів відносно решти антибіотиків статистично значущих результатів не отримано ($p>0,05$), що, можливо, зумовлено малим об'ємом вибірки з ауксотрофним фенотипом.

4.2.2 Профіль чутливості *Pseudomonas aeruginosa*

Визначення чутливості ізолятів *P. aeruginosa* до протимікробних засобів проведено в 100% випадків. Результати визначення хіміотерапевтичної чутливості *P. aeruginosa* наведені на рис. 4.21, 4.22, 4.23. Зазначимо, що для більшості антибіотиків зона затримки росту при визначенні резистентності *P. aeruginosa* є добре визначеною, проте границя чутливості на рівні 50 мм унеможлиблює повідомлення про мікроорганізм, як про чутливий до конкретного протимікробного засобу. Поняття «чутливий при збільшеній експозиції» має на увазі високу ймовірність

терапевтичного успіху в разі збільшення впливу протимікробного засобу або шляхом коригування режиму дозування, або його концентрації в місці зараження [148, 150, 151].

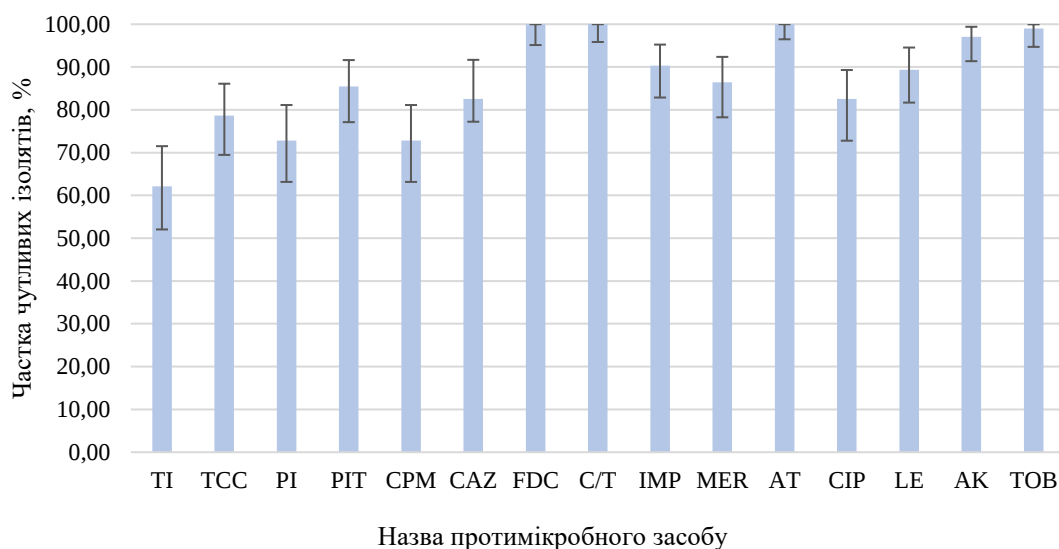


Рис. 4.21 Частка чутливих ізолятів *P. aeruginosa* при визначенні хіміотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 103; % (95%ДІ))

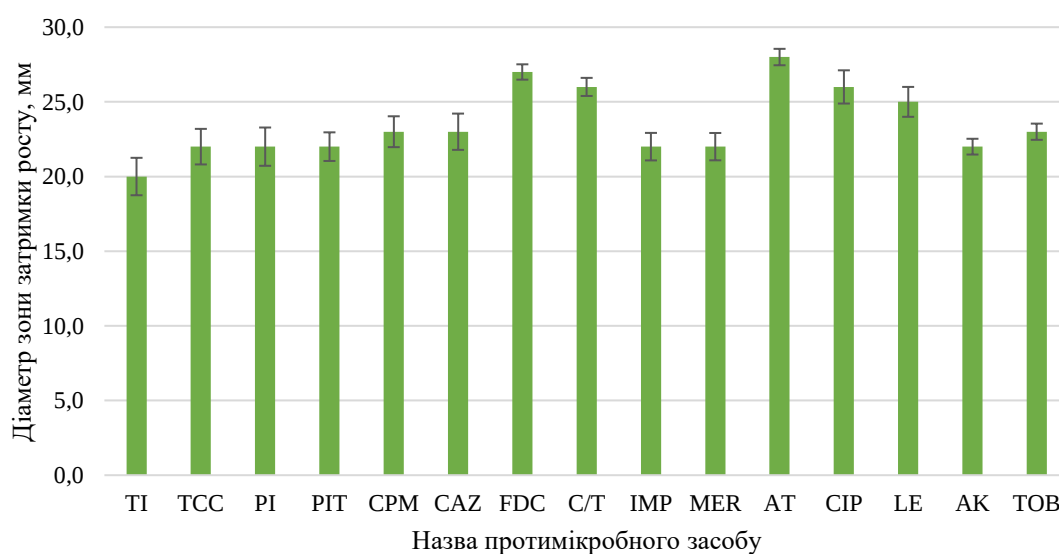


Рис. 4.22 Середні значення (Me (95%ДІ)) показників діаметру зони затримки росту *P. aeruginosa* при дослідженні їх чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом

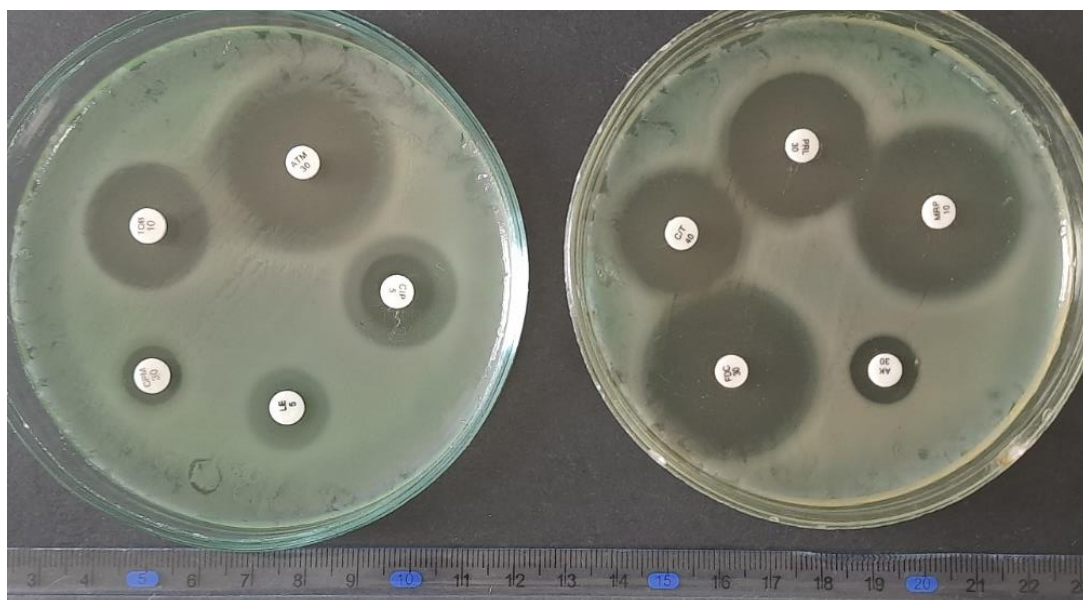


Рис. 4.23 Вивчення чутливості до антибіотиків *P. aeruginosa* мукоїдного морфотипу з продукцією піоціаніну диск-дифузійним методом. Показано резистентність до цефепіму, левофлоксацину, ципрофлоксацину та амікацину

В нашому дослідженні найбільш варіабельну чутливість ізоляти *P. aeruginosa* показували саме до β -лактамних антибіотиків – від абсолютної сприйнятливості до високої резистентності. Тож, найвищою була резистентність мікроорганізму до пеніцилінів (піперацилін, піперацилін/ тазобактам, тікарцилін, тікарцилін/ клавуланова кислота). Чутливість до усіх тестованих пеніцилінів показали 62,1% (95%ДІ 52,1-71,5) ізолятів, отримані від дітей з переміжною інфекцією *P. aeruginosa*.

Чутливість при збільшеній експозиції до цефтазідиму показали 82,5% (95%ДІ 77,1-91,6) ізолятів (n=85), при чому резистентні ізоляти були отримані від дитини з хронічною інфекцією. Аналогічно чутливість до цефепіму при збільшеній експозиції також була достатньо високою – 72,8% (95%ДІ 63,2-81,1) (n=75). Медіана зон затримки росту складала 23 мм (95%ДІ 21,8-24,2) та 23 мм (22,0-24,0) відповідно.

Сприйнятливість до азтреонаму при збільшеній експозиції становила 100%. аналогічно чутливими до цефтолозан/ тазобактаму та цефідероколу були усі протестовані ізоляти.

Зазначимо, що в нашому дослідженні *P. aeruginosa* показала здатність бути стійкою до фторхінолонів – як ципрофлоксацину, так і левофлоксацину. Проте

загальна сприйнятливість при збільшеній експозиції була достатньо високою – 89,3%. Медіана зон затримки росту складала 26 мм (95%ДІ 24,9-27,1) та 25 мм (24,0-26,0) відповідно.

Чутливість *P. aeruginosa* до аміноглікозидів була високою. Проте і в такому випадку слід наголосити, що аміноглікозиди слід призначати в комбінації з препаратами іншого ряду для підтримки активності аміноглікозиду або для розширення спектру терапії [148]. Медіана зон затримки росту складала 22 мм (95%ДІ 21,5-22,5) та 23 мм (95%ДІ 22,5-23,5) для амікацину та тобраміцину відповідно.

Не можливо випустити той факт, що була певна різниця в чутливості ізолятів з мукоїдним та немукоеїдним фенотипом. Порівняння чутливості до β -лактамних антибіотиків показало, що мукоїдні ізоляти були більш стійкі, ніж немукоеїдні. За тестом Краскела-Уоліса, мукоїдні ізоляти були менш чутливими до пеніцилінів ($p < 0,001$) та цефалоспоринів ($p = 0,036$). Мукоїдна *P. aeruginosa* показувала резистентність до меропенему та іміпенему у дітей з хронічною інфекцією. При порівнянні медіан зон затримки росту та частоти виділення чутливих ізолятів до аміноглікозидів та фторхінолонів, не отримано статистично значущих результатів ($p > 0,05$), хоча такий факт може бути пов'язаний з малим розміром мукоїдної вибірки.

Усі отримані культури *P. aeruginosa* були чутливими до колістину, $\text{МІК} \leq 4$ мкг/мл.

4.2.3 Профіль чутливості *Burkholderia cepacia complex*

Профіль хіміотерапевтичної чутливості культур *B. cepacia complex* був вивчений з визначенням МІК та врахуванням рекомендацій EUCAST щодо природної стійкості мікроорганізму [148, 149, 150, 170]. Ми проводили тестування на чутливість цефтолозану/тазобактаму та 13 інших антибіотиків. Контрольні точки для аміноглікозидів, колістину та триметоприму-сульфаметоксазолу були засновані на показниках EUCAST для неферментуючих грам-негативних мікроорганізмів [148]. Для темоциліну були використані контрольні точки використані в нещодавньому дослідженні [171]. Результати дослідження наведені в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

**Результати вивчення хіміотерапевтичної чутливості *B. ceracia complex*
(метод мікросерійних розведень; n = 7)**

Антибіотик	МІК, мг/л											КТ, мг/л	Ч, %
	0,06 ³	0,125 ³	0,25 ³	0,5 ³	1 ³	2	4	8	16 ⁴	32 ⁴	64 ⁴		
Триметоприм-сульфаметоксазол ¹				5	1	0	1					4,0/76	100
Цефтазідим			0	0	6	0	0	0	1			0,001	85,7
Цефтолозан-тазобактам ²			0	0	0	5	1	0	0	1		4,0	85,7
Темоцилін					0	0	0	2	4	1		16,0	85,7
Піперацилін-тазобактам ²				0	0	0	1	5	0	1		0,001	85,7
Піперацилін						0	0	4	1	2		0,001	71,4
Меропенем			0	0	0	6	0	0	1			2,0	85,7
Азтреонам			0	0	0	0	6	0	1	0		0,001	100
Цефепім					0	0	3	3	1			0,001	42,9
Тобраміцин					0	3	2	1				2,0	42,9
Амікацин						0	0	5	1	1		16,0	100
Тігециклін			3	3	1							0,25	85,7
Ципрофлоксацин	0	0	3	3	1							0,001	42,9
Колістин			0	0	0	0	0	0	2	3	2	4,0	0

КТ – контрольні точки для визначення «чутливий»; 0,001 мг/л – off-scale, тобто при МІК < R інтерпретувати, як «чутливий при збільшеній експозиції»

Ч – відсоток ізолятів, визначених як «чутливий» або «чутливий при збільшеній експозиції»

¹ концентрації 0,5/9,5, 1/19, 2/38, 4/76, 8/152, 16/304 та 32/608 мг/л.

² концентрація тазобактаму 4 мкг/мл

³ менше або дорівнює відповідній МІК

⁴ більше або дорівнює відповідній МІК

Загалом, МІК для β-лактамних антибіотиків широко варіювали. Таку варіацію можна пояснити потенційною наявністю кількох механізмів резистентності – продукція бета-лактамаз класу А (*PenA* і *PenB*) з характеристиками карбапенемаз широкого спектру дії, класу С (*AmpC*) та класу D; а також функціонування еффлюксних насосів та зниженої проникності зовнішньої мембрани [171].

Додавання тазобактаму до піперациліну мало тенденцію до покращення (приблизно на 14%) чутливості ізолятів *B. ceracia complex* (85,7% проти 71,4%).

Такий обмежений ефект може бути пов'язаний з тим, що тазобактам не впливає на бета-лактамази *AmpC*, тоді як авібактам впливає. В той же час, обмежений розмір вибірки не дає можливості статистично аналізувати отриманий результат. Висока активність темоциліну проти *B. ceracia complex in vitro* (85,7%), в основному через його активність проти БЛРС, була підтверджена в нашому дослідженні. Проте важливо враховувати, що майже 57,1% чутливих штамів мають МІК на точці ФК/ФД. Чутливим при збільшеній експозиції до цефепіму та азтреонаму були відповідно 42,9% і 85,7% ізолятів. Чутливість до меропенему *in vitro* становила 85,7%, що, відповідно до рекомендацій EUCAST, вказувало на продукцію карбапенемаз у резистентних ізолятів [148].

4.2.4 Профіль чутливості представників *Enterobacterales*

Чутливість сімейства *Enterobacteriaceae* до антибіотиків була варіабельною, результати дослідження наведені на рис. 4.24 і 4.25.

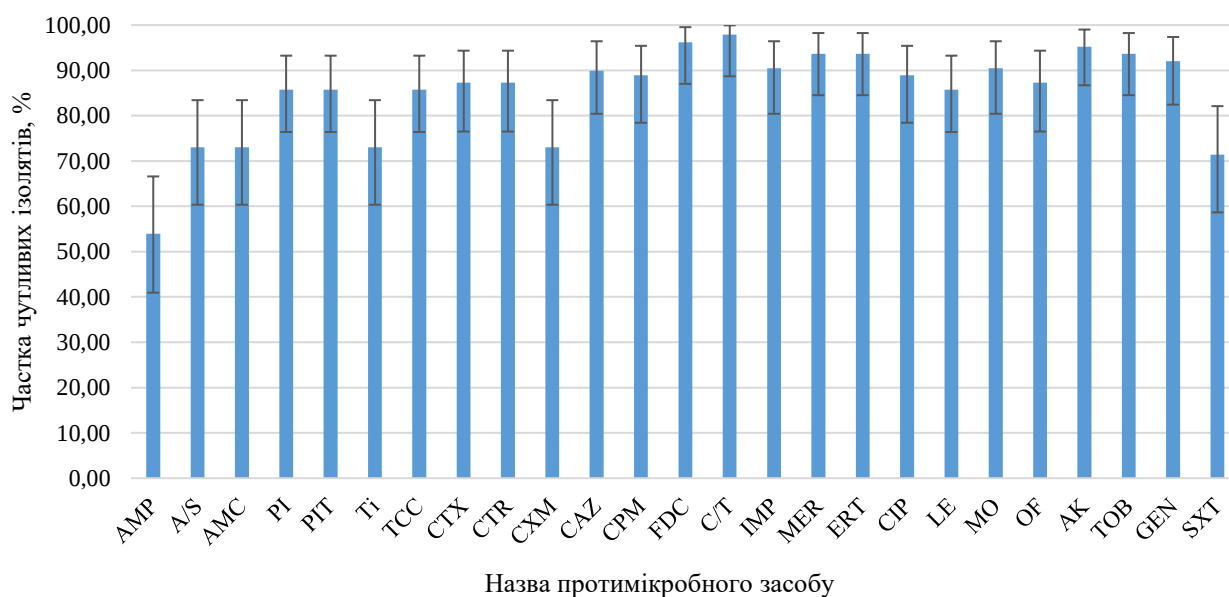


Рис. 4.24 Частка чутливих ізолятів *Enterobacterales* при визначенні хіміотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 63; % (95%ДІ))

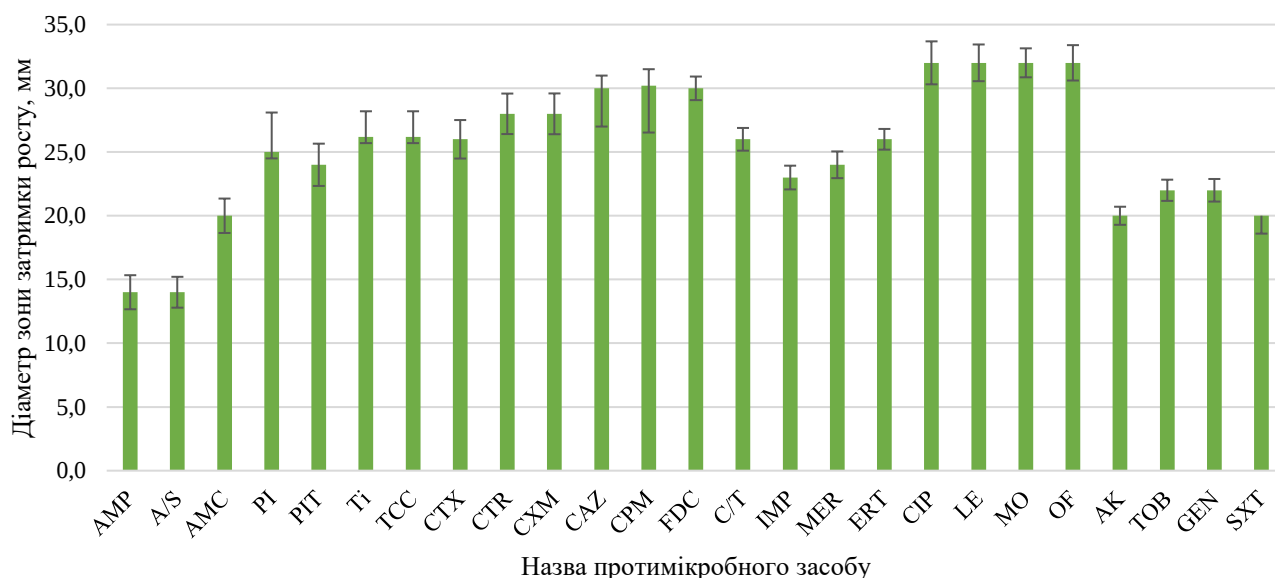


Рис. 4.25 Середні значення (Me (95%ДІ)) показників діаметру зони затримки росту *Enterobacteriales* при дослідженні чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом

Загалом представники *Enterobacteriales* мали прийнятну хіміотерапевтичну чутливість, але вона значно коливалася в залежності від групи протимікробних засобів. Сприйнятливими до ампіциліну та амоксициліну виявилися лише 54,0% (ДІ 40,9-66,6) ізолятів, проте чутливість до ампіцилін/ сульбактаму, піперациліну, піперацилін/ тазобактаму, тікарциліну та тікарциліну/ клавуланової кислоти коливалася в межах 73,0 – 85,8 %. Чутливість до цефалоспоринів була варіабельною – найкращі результати отримані для цефалоспоринів 5-го покоління, а також цефтазідиму і цефепіму – 89,9%, 88,9% відповідно. Чутливість до фторхінолонів та аміноглікозидів також була високою. Абсолютна сприйнятливість зареєстрована до азтреонаму.

Скринінг на продукцію БЛРС та карбапенемаз з використанням відповідних хромогенних середовищ був позитивним епізодично (рис. 4.26).

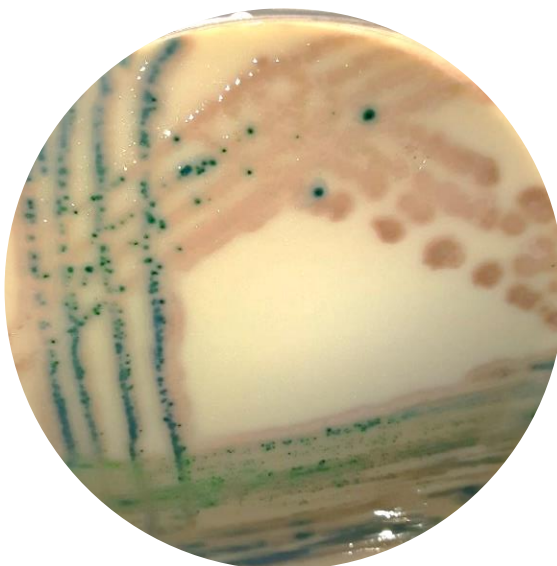


Рис. 4.26 Культура *K. pneumoniae* продукує БЛРС на хромогенному агарі ESBL (синьо-зелений колір), 24 год

4.2.5 Профіль чутливості грибів

Профіль хіміотерапевтичної чутливості отриманих грибів аналізований з визначенням МІК. Дані наведено у табл. 4.3 та 4.4.

Гриби роду *Candida* демонстрували здебільшого хорошу хіміотерапевтичну чутливість, окрім ізоляту *C. glabrata*, який виявився стійким до флуконазолу.

Усі ізоляти *A. fumigatus* були чутливими до ітраконазолу (0,25-10,0 мг/л), воріконазолу (0,076-0,87 мг/л) та амфотерицину В (0,45-0,986 мг/л). Культура *A. flavus* була чутливою до ітраконазолу.

Таблиця 4.3

Профіль чутливості грибів роду *Candida* до антимікотичних засобів (МІК; n = 70).

Ізолят/ Антимікотик	n	Амфотерицин В		Флуконазол		Ітраконазол		Воріконазол	
		Ч, %	мг/мл	Ч, %	мг/л	Ч, %	мг/л	Ч, %	мг/л
<i>C. albicans</i>	61	100,0	0,125-1	90,2	0,5-2,5	90,5	0,01-0,106	100	0,060
<i>C. gladioli</i>	4	100,0	0,0625-1	50,0	0,125-1	40,0	0,125	100	0,125
<i>C. glabrata</i>	5	100,0	0,5-1	100,0	0,5-2	-	-	-	-

Профіль чутливості цвілевих грибів до антимікотичних засобів (МІК; n = 17).

Ізолят/ Антимікотик	Амфотерицин В		Ітраконазол		Воріконазол	
	Ч, %	мг/л	Ч, %	мг/л	Ч, %	мг/л
<i>A. fumigatus</i>	100,0	0,45-0,986	100,0	0,25-1	100,0	0,076-0,87
<i>A. flavus</i>	-	-	100,0	0,036-0,125	-	-

4.3 Адгезивні властивості культур основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом

Біоплівки — це структуровані угруповання бактерій, обмежені загальною захисною полімерною мембраною й прикріплені до інертної або живої поверхні. По суті біоплівки є захисною «нішею», у якій бактерії можуть розмножуватися та виживати в різних несприятливих умовах. Стадії біоплівкоутворення є наступними: існування планктонних клітин → їх адгезія до поверхні (біологічної або абіотичної) → продукція екзополісахаридного матриксу, дозрівання → дисперсія. Адгезія мікроорганізмів є важливим фактором вірулентності, і визначає перший етап колонізації субстратів [74, 75, 76].

Для вивчення адгезивних властивостей основних патобіонтів, асоційованих з МВ було відібрано по 1 ізоляту від дитини. Всього в дослідженні було задіяно 28 ізолятів *S. aureus* та 14 ізолятів *P. aeruginosa*.

ІАМ клінічних ізолятів *S. aureus* знаходився в межах 1,75 – 6,58, середнє значення – 3,78 (0,24), що відповідає середньому адгезивному потенціалу. Серед усіх культур *S. aureus*, отриманих від дітей з МВ, не було таких з низьким або відсутнім адгезивним потенціалом, середньо адгезивними були 67,9% ізолятів (n = 19), високо адгезивними – 21,4% ізолятів (n = 6).

Індекс адгезивності ізолятів *P. aeruginosa* знаходився в межах 2,89 – 8,44, середнє значення – 5,73 (0,55), що відповідає високому адгезивному потенціалу. Серед усіх культур *P. aeruginosa*, отриманих від дітей з МВ, не було таких з низьким або відсутнім адгезивним потенціалом, середньо адгезивними були 28,6% ізолятів, а

високо адгезивними – 71,4%. Такі результати свідчать про високий вірулентний потенціал даного представника грам-негативної мікробіоти.

Результати експериментальної частини дослідження зображені на рис. 4.27 і 4.28.

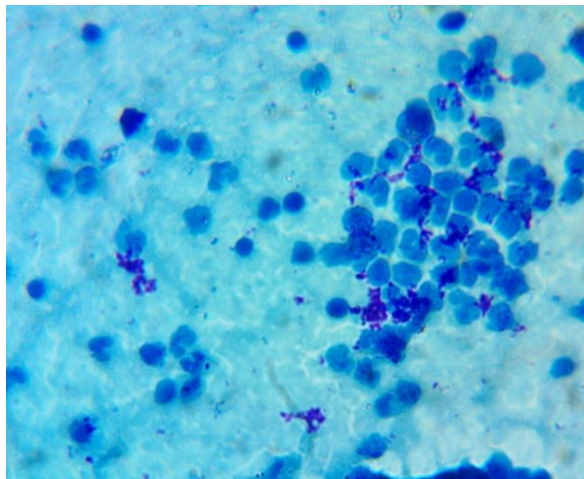


Рис. 4.27 Взаємодія *S. aureus* з еритроцитами барана. Забарвлення за Романовським-Гімзою. Збільшення 40х.

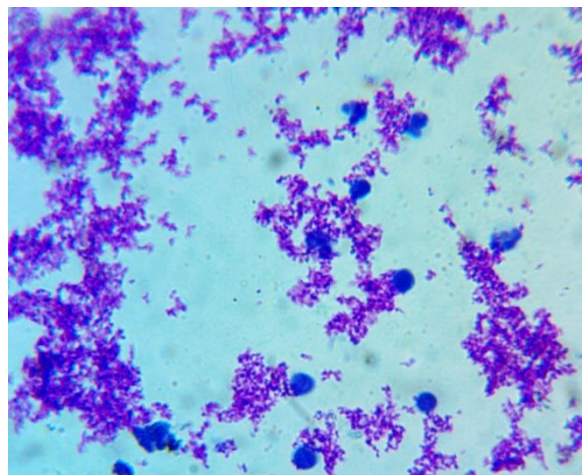


Рис. 4.28 Взаємодія *P. aeruginosa* з еритроцитами барана. Забарвлення за Романовським-Гімзою. Збільшення 40х

4.4 Біоплівкоутворюючі властивості культур основних патобіонтів асоційованих з муковісцидозом

Мікроорганізми *S. aureus* та *P. aeruginosa* здатні утворювати біоплівки на поверхнях різного походження, як біотичних так і абіотичних. Матрикс біоплівок *S. aureus*, як правило, складається з позаклітинної ДНК, білків, амілоїдних фібрил та/або ПМА [168, 171, 170], проте особливості можуть різнитися залежно від штаму. Матрикс *P. aeruginosa* складається в основному з альгінату [76, 80]. Оскільки утворення біоплівки *S. aureus* та *P. aeruginosa* є важливим фактором патогенезу МВ, дослідження цього процесу було одним з центрових в ході даної наукової роботи.

4.4.1 Біоплівкоутворюючі властивості *Staphylococcus aureus*

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур *S. aureus*, отриманих від дітей хворих на МВ, показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки (рис. 4.29). При цьому 28,57% ізолятів мали слабку ефективність біоплівкоутворення, а 53,57% – середню, 17,86% - високу.

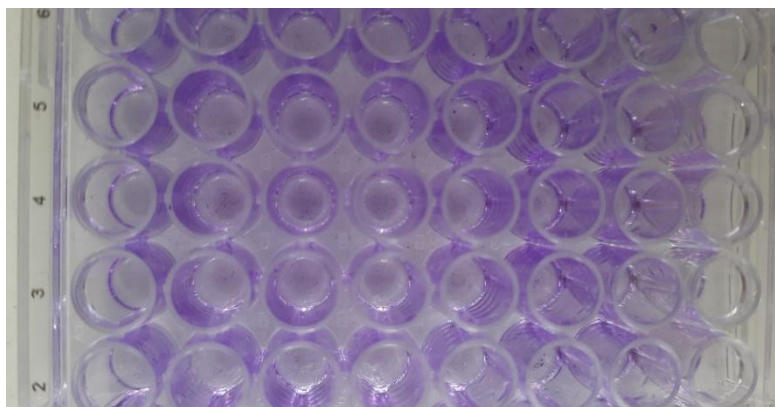


Рис. 4.29 Вивчення біоплівкоутворення *S. aureus* в мікротитраційному планшеті, 24 год. Фарбування 0,1% кристалічним фіолетовим; вид зверху вниз. Стінки та дно лунок забарвлені рівномірно. *S. aureus*, як не рухливий мікроорганізм, утворює біоплівку на дні лунки.

Між адгезивним потенціалом *S. aureus* та біоплівкоутворюючою активністю мікроорганізму існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена $r_s = 0,84$ ($p < 0,001$). Зв'язок між ІАМ та оптичною щільністю утворених біоплівок був прямим, високим. Результати дослідів узагальнені та схематично зображені на рис. 4.30.

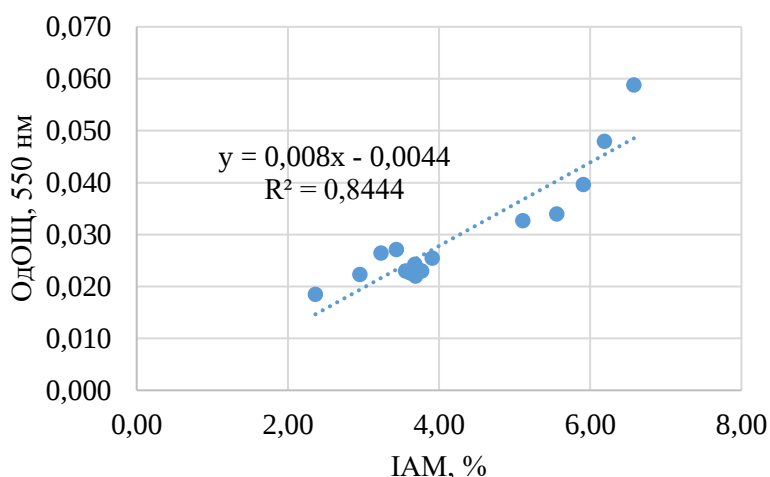


Рис. 4.30 Кореляційна залежність ефективності біоплівкоутворення від адгезивного потенціалу *S. aureus* ($n = 28$; $r_s = 0,84$ (95%ДІ 0,673 – 0,922))

Аналіз швидкості біоплівкоутворення показав, що на першій добі культивування у дослідних лінках процес відбувається уповільнено – за перші 6 та 12 год кількість життєздатних клітин становила 4,41 (0,07) та 5,14 (0,13) lg/мл відповідно ($p = 0,048$). Але на кінець першої доби культивування накопичена кількість КУО збільшилася становила 8,01 (0,095) lg КУО/мл (рис. 4.31).

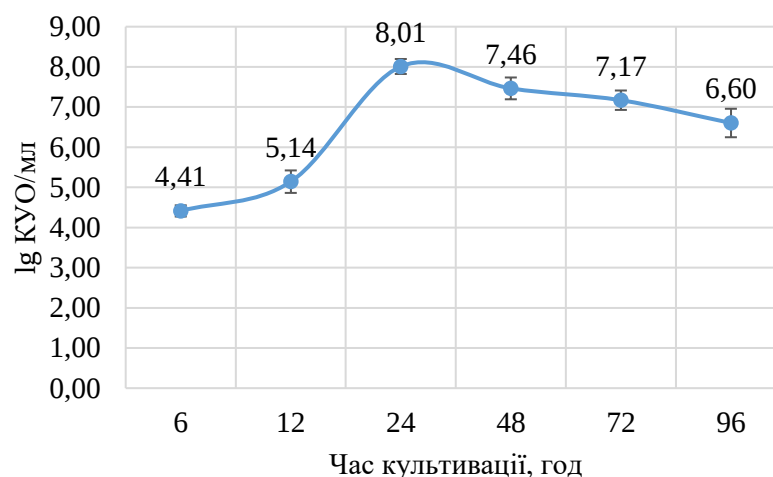


Рис. 4.31 Динаміка утворення біоплівки *S. aureus* (M(m) КУО lg/мл).

Починаючи з 2-ї доби культивування кількість мікробних клітин на поверхні полістиролового планшету мала тенденцію до зниження – 7,46 (0,14) КУО lg/мл, але різниця ще не була статистично значущою – $p = 0,217$. Мікробне навантаження в

утвореній біоплівці залишалося сталим починаючи з 2-ї доби культивування ($p = 0,368$ і $p = 0,191$ для 72 год та 96 год відповідно в порівнянні з результатом 2-ї доби). Такий факт можна пояснити тим, що на даному етапі, скоріш за все, подальша організація мікробного консорціуму має якісний характер, а подальший кількісний ріст є обмеженим через виснаження нутрітивних компонентів середовища та накопиченням токсичних продуктів бактеріального метаболізму. Суттєве обмеження мікробного навантаження в порівнянні з кінцем 1-ї доби досліджу, відмічали через 72 год – зменшення відбулося в 11,7 разів, $p = 0,028$.

Мікроскопічна картина динаміки утворення біоплівки представлена на рис. 4.32 А-Д. Формування біоплівок клінічними ізолятами *S. aureus*, отриманими від дітей хворих на МВ, мало стадійний маси над масою матриксу. На кінець 12 год культивування звертала увагу наявність агрегаційних конгломератів, з'єднаних між собою перемичками (рис. 4.32 А), в подальшому проміжки між агрегатами ставали щільнішими, формування біоплівки набувало три-направленого характеру (рис. 4.32 Б). На кінець 2-ї доби культивування біоплівка була складно організованою, все ще зберігала пористу структуру, але містила мікроколонії, в яких візуально вже не можна було виокремити мікробні клітини. Окрім того, відбулася суттєва накопичення бактеріального матриксу (рис. 4.32 В). На кінець 3-ї доби культивування і в подальшому мікроархітектура біоплівки під світловим мікроскопом мала вигляд моношару (рис. 4.32 Г), на дистальних ділянках та в місцях стоншення можна було розрізнити вивільнення планктонних клітин (рис. 4.32 Д). Спостереження за стадією деградації біоплівки не було серед завдань дослідження. Отримана мікроскопічна картина підтверджує тезу про складні якісні процеси при дозріванні біоплівки після 48 год культивування.

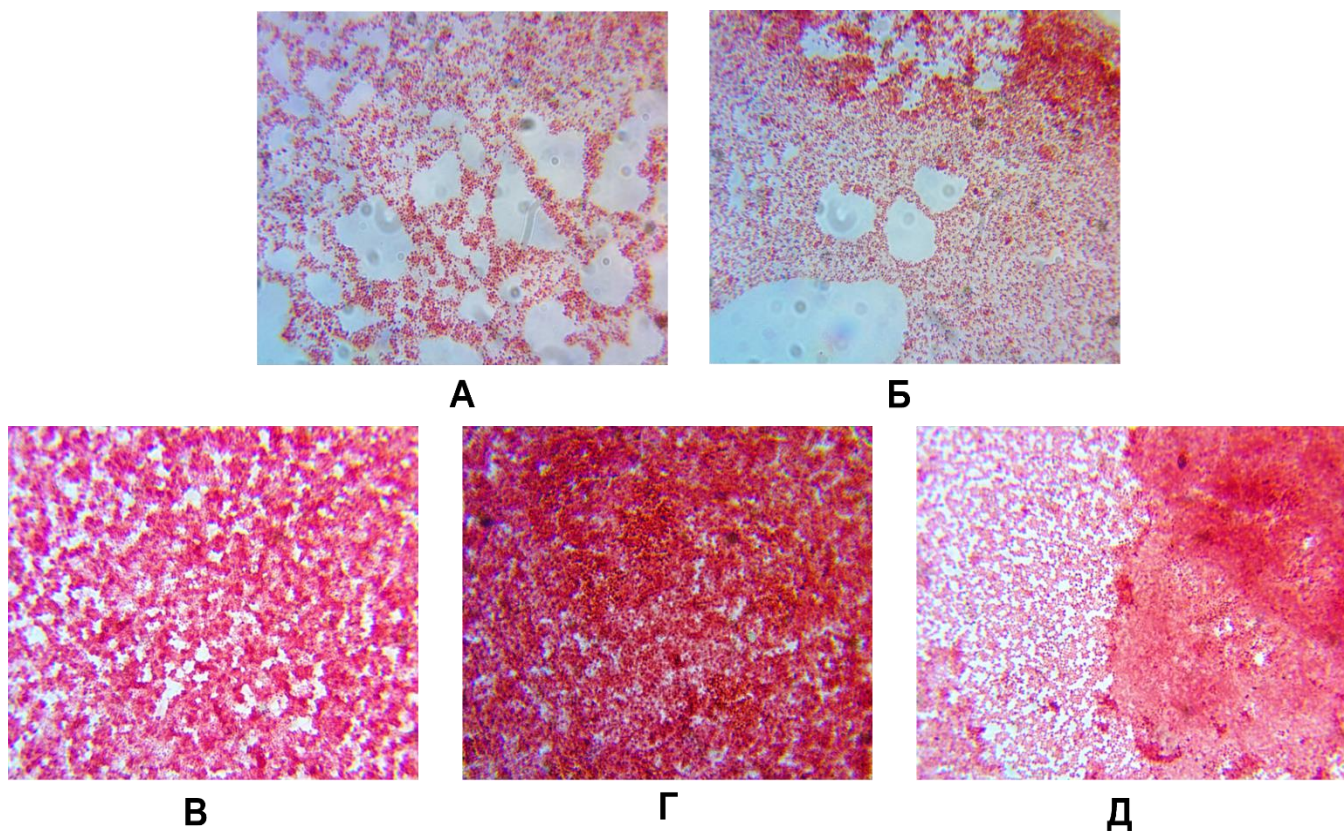


Рис. 4.32 Мікроскопічна картина динаміки формування біоплівки (світлова мікроскопія, збільшення x800, фарбування Конго червоний). А – 12 год культивування, Б – 24 год культивування, В – 48 год культивування, Г і Д – 72 год культивування.

Насичений червоний колір – планктонні та вбудовані в матрикс бактеріальні клітини, ніжний блідо-рожевий колір – матрикс біоплівки.

4.4.2 Динаміка утворення біоплівок клінічними ізолятами *P. aeruginosa* в закритій системі *in vitro*.

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур *P. aeruginosa*, отриманих від дітей, хворих на МВ, показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки. При цьому 35,7% ізолятів мали помірну ефективність біоплівкоутворення, а 42,9% – високу (рис. 4.33).

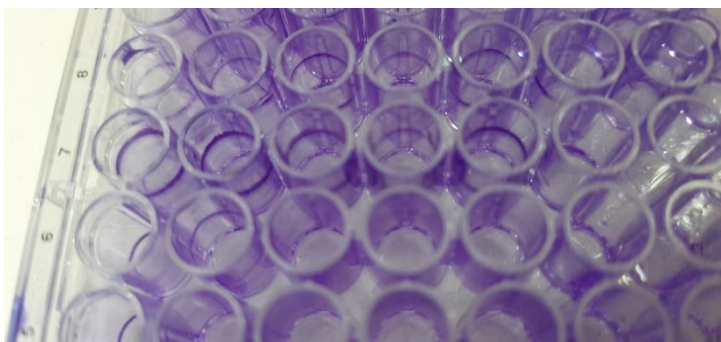


Рис. 4.33 Вивчення біоплівкоутворення *P. aeruginosa* в мікротитраційному планшеті, 24 год. Фарбування кристалічним фіолетовим; вид збоку. *P. aeruginosa* як рухомий мікроорганізм утворює біоплівку на межі повітря-рідина.

Між адгезивним потенціалом *P. aeruginosa* та біоплівкоутворюючою активністю мікроорганізму існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена $r_s = 0,95$ ($p < 0,001$). Зв'язок між ІАМ та оптичною щільністю утворених біоплівок був прямим, сильним. Результати досліджу загалом на рис. 4.34.

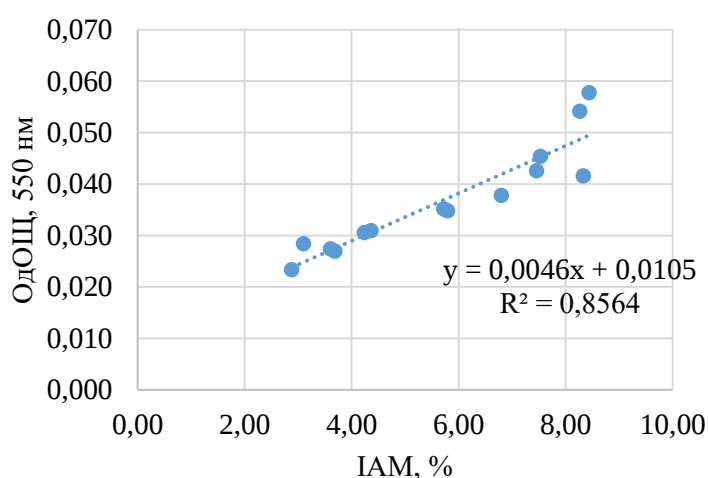


Рис. 4.34 Кореляційна залежність ефективності біоплівкоутворення від адгезивного потенціалу *P. aeruginosa* ($n = 14$; $r_s = 0,952$ (95%ДІ 0,851 – 0,985))

Аналіз швидкості біоплівкоутворення показав, що вже на першій добі культивування процес накопичення мікробної маси також відбувався стрімко, в перші 6 та 12 год – кількість життєздатних клітин становила 4,54 (0,12) та 6,0 (0,250) lg/мл відповідно ($p = 0,103$), за цей час було накопичено 66% загальної біомаси. До кінця

першої доби культивування накопичена кількість КУО продовжувала збільшуватися – через 24 год мікробне навантаження складало 9,09 (0,170) lg КУО/мл (рис. 4.35).

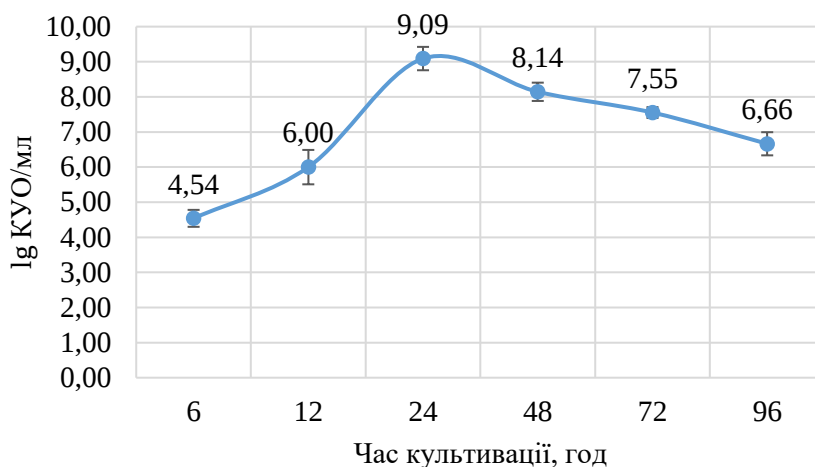


Рис. 4.35 Динаміка утворення біоплівки *P. aeruginosa* (M(m) КУО lg/мл).

Після 24 год динаміка кількості життєздатних бактеріальних клітин мала тенденцію до зменшення, проте суттєве обмеження кількості КУО відмічали на кінець 96-доби дослідження, коли втрата мікробного навантаження становила 36,42% – $p = 0,039$. Починаючи з кінця 1-ї доби дослідження відбувалося подальше дозрівання бактеріального консорціуму, але не за рахунок накопичення мікробної маси – $p = 0,247$ і $p = 0,252$ для 48 год та 72 год відповідно.

Особливості утворення біоплівок клінічними ізолятами *P. aeruginosa*, виділених від дітей, хворих на муковісцидоз, ілюстровані рис. 4.36 А-Д. Процес утворення біоплівок клінічними ізолятами *P. aeruginosa* був стадійним, багатоцентричним і вирізнявся швидшим, в порівнянні зі *S. aureus*, накопиченням біологічної маси зі значною питомою вагою полісахаридного матриксу.

Утворення мікроколоній прослідковувалося вже під час перших 24 год дослідження. На початкових етапах відмічали появу відособлених острівців-конгломератів – 6 год (рис. 4.36 А), які в подальшому зливалися у більші за розмірами та щільніші структури – 12 год (рис. 4.36 Б). На кінець 1-ї доби дослідження можна було побачити макроскопічно сформовану плівку на границі рідина-повітря. Мікроскопічно – пористу тривимірну структуру зі складною архітектонікою та суттєвим

накопиченням матриксу, в якому складно вирізнити окремі мікробні клітини (рис. 4.36 В). Пориста структура біоплівки ущільнилася протягом наступної доби культивування, продовжувалося накопичення маси біоматриксу (рис. 4.36 Г і 4.36 І).

Після 72 год біоплівка являла собою щільну замкнену структуру з рясними викидами планктонних клітин на дистальних ділянках (рис. 4.36 Д).

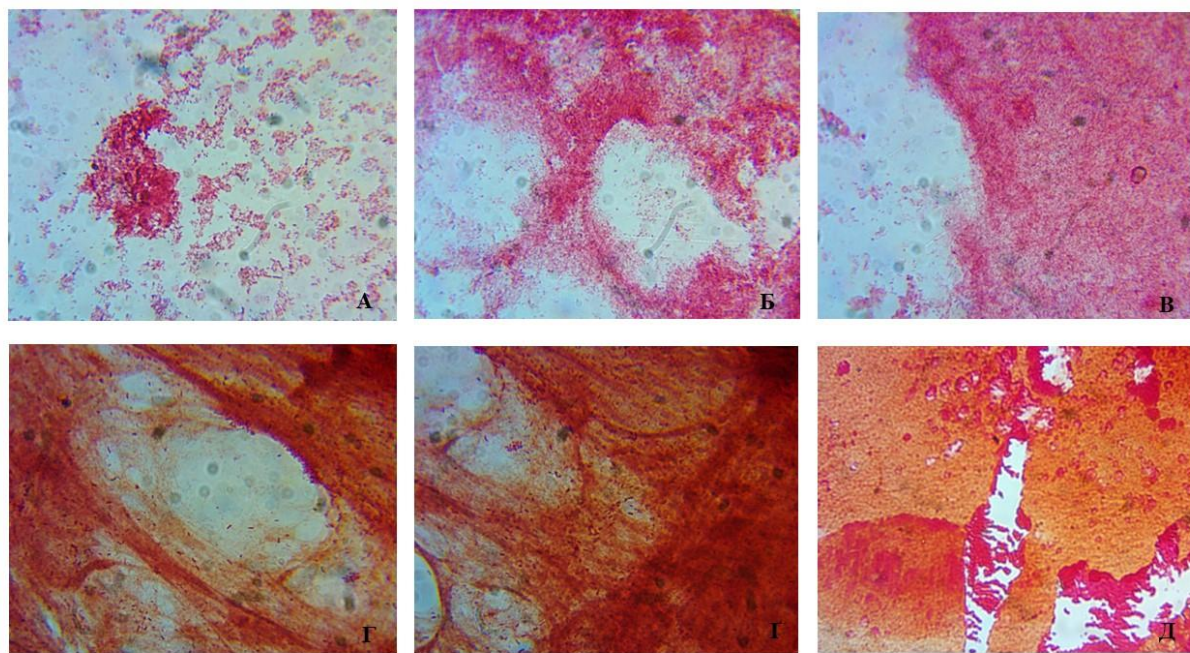


Рис. 4.36 Мікроскопічна картина динаміки формування біоплівки (світлова мікроскопія, збільшення $\times 800$, фарбування Конго червоний). А – 6 год культивування, Б – 12 год культивування, В – 24 год культивування, Г і І – 24 год культивування, Д – 72 год культивування.

Насичений рожевий колір – планктонні та вбудовані в матрикс бактеріальні клітини, ніжний блідо-рожевий та помаранчевий колір – матрикс біоплівки. Відмінності в інтенсивності забарвлення рисунків пов'язані з накопиченням питомої ваги екзополісахариду.

4.5 Антагоністичний вплив пробіотичних культур на патобіоти асоційовані з муковісцидозом у дітей

Оскільки прямий антагонізм є одним з важливих важелів ефективності пробіотиків, в наступній серії експериментів вивчалась антагоністична активність пробіотичних культур *B. clausii* та *A. viridans*.

Пробіотичні спороутворюючі палички *B. clausii* не є коменсалами організму людини, проте мають доведену ефективність в комплексному лікуванні інфекційних захворювань, корекції та профілактиці дисбіозу [119]. Тож, на даному етапі ми вивчали вплив *in vitro* комерційного штаму *B. clausii* на патогенів асоційованих з муковісцидозом.

Аутосимбіонти роду *Aerococcus* виступають перспективними претендентами на роль пробіотичних мікроорганізмів, особливо з огляду на природність їх походження для організму людини та потенційно відсутні ризики несприятливих подій [113, 120, 122, 123, 124, 125]. Проте потенціал використання їх в якості засобів корекції мікробіоценозів розкрито недостатньо, тому також було поставлено за мету дослідити можливості впливу аутосимбіонтів на патогенні та опортуністичні культури, отримані від дітей хворих на МВ.

4.5.1 Мікробіологічна характеристика аутосимбіонтів *Aerococcus spp.*, виділених з дихальних шляхів дітей хворих на муковісцидоз

Медико-екологічне значення представників роду *Aerococcus* залишається відкритим питанням. З одного боку накопичена база знань свідчить про, безумовно, сприятливий потенціал *A. viridans* [113, 123, 124, 125], проте з іншого в останні роки з'являються свідчення про випадки інфекцій сечовивідних шляхів, сепсису, ендокардиту та ураження шкіри, викликані даним мікроорганізмом [175-179].

В нашому дослідженні частка ізолятів *Aerococcus* складала лише 3,4% (n = 26), при чому більшість переважна отримана з орофарингеальних зразків, n = 17. Загалом, культуру виділено з 6,7% відібраних проб. На кров'яному агарі відмічали ріст дрібних безбарвних колоній з α -гемолітичною активністю, але чутливість даного середовища становила лише 19% через ріст інших патогенів та коменсалів. На селективному агарі з бензидином [180], отримали хороші ростові показники, колонії, ідентифіковані в подальшому, як *A. viridans* мали інтенсивне забарвлення (рис. 4.37).



Рис. 4.37 Культура *A. viridans* на селективному середовищі з бензидином, 48 год

Точність біохімічної ідентифікації *A. viridans* становила 74,3-99,8%. Були враховані наступні показники: каталаза – негативна, проба на гідроліз пірролідоніл- β -нафтіламідю – позитивна, ріст в присутності 6,5 % *NaCl* та чутливість до ванкоміцину.

В нашому дослідженні при визначенні хіміотерапевтичної чутливості культури *A. viridans* спиралися на кінцеві точки для *Aerococcus sanguinicola* та *Aerococcus urinae* [148]. Усі ізоляти були чутливими до меропенему, скринінгу з норфлуксацином, ванкоміцину та ріфампіцину. Чутливими до бензилпеніциліну та амоксициліну були 88,46% ізолятів, до ампіциліну – 84,6%.

4.5.2 Антагоністичний вплив аутосимбіонтів роду *A. viridans* на патогенні культури, виділені з дихальних шляхів дітей, хворих на муковісцидоз

Для дослідження ми відібрали 12 унікальних ізолятів *A. viridans*, отриманих з дихальних шляхів дітей, хворих на МВ. Дослідження відстроченого антагонізму проводилися проти культур патогенів, раніше отриманих від цих дітей. Аутосимбіонти *A. viridans* мали виражений антагоністичний потенціал проти опортуністів та патогенів (активні та помірно активні), виділених з дихальних шляхів

дітей, хворих на МВ ($F = 9,24$; $p < 0,001$). Розмір зон затримки росту *A. viridans* становив 14,0 (0,8) мм для *S. aureus*, 6,5 (1,75) мм для *P. aeruginosa*, 11,5 (0,5) мм для *K. pneumoniae*, 12,5 (0,98) мм для *E. coli*, 14 (1,09) мм для *C. albicans*. Тож, найкращі результати отримані для грибів роду *Candida*, представників сімейства *Enterobacteriaceae* та одного з ключових патогенів при МВ – *S. aureus*. НФГНМО виявилися найбільш резистентними до дії пробіотичної культури *Aerococcus*. На рис. 4.38 зображено результати експерименту з відстроченого антагонізму на прикладі ізоляту *A. viridans* 02.20MB.



Рис. 4.38 Антагонізм *A. viridans* 02.20MB відносно патобіонтів асоційованих з МВ, 24 год

На наступному етапі ми порівняли антагоністичний потенціал аутосимбіонтів та музейної культури *A. viridans* 167. Музейний штам також мав активність проти культур, задіяних в дослідженні ($F = 4,00$; $p = 0,019$). Подібно до клінічних ізолятів, *A. viridans* 167 був активним проти грибів роду *Candida* – 12,0 (1,6) мм, *S. aureus* – 12,0 (0,85) мм, *E. coli* та *K. pneumoniae* – 9,2 (0,8) мм і 11,5 (0,5) мм відповідно. Різниця середнього значення зони затримки росту в дослідях з симбіонтом та музейним штамом становила у *S. aureus* 2 мм, $p = 0,04$; *E. coli* – 3 мм, $p = 0,04$. Такі результати підтверджують гіпотезу про те, що полімікробність в дихальних шляхах при МВ справляє селективний вплив на патогенів та коменсалів, що їх населяють. А отже,

стимуляція ендогенної мікробіоти потенційно може бути одним з перспективних напрямків супутньої терапії МВ.

4.5.3 Антагоністичний вплив пробіотичних мікроорганізмів роду *Bacillus* на патогенні культури, виділені з дихальних шляхів дітей хворих на муковісцидоз

Мікроорганізм *B. clausii* мав сильний та помірний антагоністичний потенціал проти опортуністів та патогенів, виділених з дихальних шляхів дітей, хворих на МВ ($F = 18,50$; $p < 0,001$). Затримка росту *S. aureus* складала 12,1 (1,64) мм, *P. aeruginosa* – 8,6 (0,6) мм, *K. pneumoniae* – 12 (2,4) мм, *E. coli* – 9,6 (0,98) мм, *C. albicans* – 15 (0,90) мм.

При вивченні відстроченого антагонізму в дослідях з *B. clausii* отримано результати подібні до аутосимбіонтних ізолятів ($r_s = 0,77$; $p < 0,01$) та музейного штаму *A. viridans* ($r_s = 0,65$; $p < 0,05$). Але середнє значення зони затримки росту *E. coli* в досліді з аутосимбіонтами *A. viridans* перевищувало результат з *B. clausii* на 2 мм, $p = 0,04$.

4.6 Узагальнення результатів дослідження

Особливості внутрішнього мікросередовища дихальних шляхів при МВ призводять до набуття патобіонтами не типових для них властивостей. Ауксотрофна модифікація *S. aureus* та фенотипова трансформація *P. aeruginosa* мають важливе практичне та прогностичне значення. Атиповість патобіонтів, асоційованих з МВ, може бути причиною помилок ідентифікації або навіть упущенні через ненавмисне недотримання умов культивування, а отже мати наслідки для життя та здоров'я пацієнта.

Культуральні особливості *S. aureus*. В нашому дослідженні 88,9% виділених ізолятів *S. aureus* ($n = 201$) мали типові культуральні, морфологічні та біохімічні характеристики. Окрім культур *S. aureus* дикого типу також виділяли МКФ – 11,1%. Поширеність патогену в літературі складає близько 30%, що є значно більшим за наш результат, можливо, через більш широку вікову категорію учасників, включених в раніше опубліковані дослідження [44, 45].

Ауксотрофні культури в 84% випадків в отримували після лікування аміноглікозидами та/або сульфаніламидами, а також при інфікуванні *P. aeruginosa* ($\chi^2=49,99$; $p<0,001$). МКФ *S. aureus* можна було відновити на кров'яному або шоколадному агарі. МКФ з'являлися через 48-72 год від початку інкубації в аеробних або мікроаерофільних умовах та мали вигляд дрібних (діаметр <1 мм), непігментованих, негемолітичних колоній, іноді по типу «яєчні». За морфологією колоній МКФ *S. aureus* іноді можна було сплутати з негемолітичними стрептококами. Попередні дослідження морфології МКФ *S. aureus* показали, що вірогідність виділення ауксотрофів є можливим переважно в кров-вмісних середовищах [127]. Показано, що *P. aeruginosa* стимулює появу ауксотрофії до менадіону та геміну через продукцію сполуки 2-N-гептил-4-гідроксихіноліну-N-оксиду та сидерофорів [43]. Ауксотрофія до тимідину, зазвичай, пов'язана з тривалим лікування сульфаніламидами, які конкурентно інгібують фермент, відповідальний за утворення дигідрофолієвої кислоти [44].

В нашому дослідженні чутливими до усіх β -лактамів були лише 20,4% (95%ДІ 53,7-79,6) ізолятів. *S. aureus*. Чутливість до цефоксітину мали 94,7% ізолятів, отже частка MRSA – 3,5%, що суттєво менше, ніж описано раніше (25% - США, 11% - Європа) [127]. Чутливість до скринінгу з еритроміцином становила 75,7%, з норфлоксацином – 77,7%, з тетрацикліном – 98,7%. При порівнянні хіміотерапевтичної чутливості *S. aureus* з диким фенотипом та ауксотрофною модифікацією отримано подібні результати, проте спостерігалася тенденція до наростання резистентності до β -лактамів та гентаміцину.

Культуральні особливості *P. aeruginosa*. На цетиримідному агарі з гліцерином та агрі Ендо ізоляти роду *Pseudomonas* утворювали 3 основних типи колоній – мукоїдні, великі випуклі блискучі та невеликих розмірів неправильної форми – МКФ. Частка мукоїдів становила 27,2% ($n = 26$) від усіх ізолятів, МКФ – 5,8% ($n = 6$). Варто зазначити, що агар Ендо мав більшу результативність з відновлення *P. aeruginosa* з клінічного зразка в порівнянні з селективним цетримідним агаром. 67,62% ($n = 71$). Мукоїдні ізоляти на кров'яному агарі проявляли α - та β -гемолітичну активність. МКФ *P. aeruginosa* були непігментованими і не проявляли гемолітичної активності, на

відміну від мукоїдного та дикого морфотипів. Інфекція *P. aeruginosa* з мукоїдним фенотипом була асоційована з виділенням грибів роду *Aspergillus spp.* ($\chi^2=33,82$; $p<0,001$) та роду *Candida* ($\chi^2=26,07$; $p<0,001$). За літературними даними розрахункова поширеність змішаної інфекції *P. aeruginosa* та *A. fumigatus* серед пацієнтів з МВ становить 15,8% (95%ДІ 2,3 – 44,8), але істинні цифри оцінити складно через відсутність стандартизованого підходу до діагностики та особливостей клінічної інтерпретації отриманих результатів. Показано, що така ко-інфекція пов'язана з швидким погіршенням легеневої функції [50].

Наступною особливістю *P. aeruginosa* була здатність до продукції пігментів піоціаніну та піовердину, які є одним з факторів вірулентності.

В нашому дослідженні найбільш варіабельну чутливість ізоляти *P. aeruginosa* показували саме до β -лактамних антибіотиків – від абсолютної сприйнятливості до високої резистентності. Тож, найвищою була резистентність мікроорганізму до пеніцилінів, але чутливість до цефтазідиму складала 82,5%, до цефепіму – 72,8%. Сприйнятливість до азтреонаму при збільшеній експозиції становила 100%. Чутливість *P. aeruginosa* до аміноглікозидів та фторхінолонів також була високою. Усі отримані культури *P. aeruginosa* були чутливими до колістину, $\text{MIC} \leq 4$ мкг/мл. В дослідженні, опублікованому *Ekkelenkamp та ін. (2020)* частка ізолятів стіких до цефепіму, цефтазідиму, цефтолозан/ тазобактаму, піперацилін/ тазобактаму, меропенему, іміпенему та азтреонаму становила відповідно 14%, 11%, 3%, 12%, 18%, 32% та 23%. В нашому дослідженні не було ізолятів стійких до цефалоспоринів V покоління.

Порівняння чутливості до β -лактамних антибіотиків показало, що мукоїдні ізоляти були більш стійкі, ніж немуккоїдні до пеніцилінів ($p<0,001$) та цефалоспоринів ($p=0,04$).

Культуральні особливості *B. serasia complex*. Виділення культури *B. serasia complex*, на відміну від її ідентифікації, не викликало складнощів. Для мікроорганізму характерним був відносно повільний ріст з появою колоній після 48-72 год інкубації. На середовищі BCSA мікроорганізм продукував розлогі жовтуваті колонії, оточені жовтим ареолом. При визначенні хіміотерапевтичної чутливості *B.*

serasia complex показано, що додавання тазобактаму до піперациліну приблизно на 14% покращує активність протимікробного агенту. Чутливим при збільшеній експозиції до цефепіму та азтреонаму були 42,9% і 85,7% ізолятів відповідно.

Культуральні особливості *Enterobacterales*. Роль представників *Enterobacterales* в патогенезі МВ залишається обговорюваною і, скоріше за все, не є прогностично значущою. Серед ізолятів, отриманих від дітей, хворих на МВ, не було культур *Enterobacteriaceae* з атиповими властивостями. Чутливість сімейства *Enterobacteriaceae* до антибіотиків була варіабельною – серед цефалоспоринів найкращі результати отримані для цефтазідиму та цефепіму. Скринінг на продукцію БЛРС та карбапенемаз був позитивним епізодично. Чутливість до фторхінолонів та аміноглікозидів також була високою.

Культуральні особливості грибів. Серед культур грибів були як приналежні до дріжджових, так і до цвілевих. Для *A. fumigatus* та *A. flavus* характерною була поява повільно-зростаючих, розгалужених пухнастих колоній агарі Сабуро після 72-96 год культивування. Морфологія колоній – широкорозгалужені складчасті з зеленуватим та жовтушним забарвленням відповідно.

Гриби роду *Candida* демонстрували здебільшого хорошу хіміотерапевтичну чутливість, окрім ізоляту *C. glabrata*, який виявився стійким до флуконазолу. Усі ізоляти *A. fumigatus* були чутливими до ітраконазолу (0,25-10,0 мг/л), воріконазолу (0,076-0,87 мкг/мл) та амфотерицину В (0,45-0,986 мг/л). Культура *A. flavus* була чутливою до ітраконазолу 0,076 (0,04) мг/л.

Адгезивний потенціал патобіонтів асоційованих з МВ. Для вивчення адгезивних властивостей основних патобіонтів, асоційованих з МВ було відібрано по 1 ізоляту від дитини. Всього в дослідженні було задіяно 28 ізолятів *S. aureus* та 14 ізолятів *P. aeruginosa*.

ІАМ клінічних ізолятів *S. aureus* знаходився в межах 1,75 – 6,58, середнє значення – 3,78 (0,24), що відповідає середньому адгезивному потенціалу. ІАМ *P. aeruginosa* знаходився в межах 2,89 – 8,44, середнє значення – 5,73 (0,55), що відповідає високому адгезивному потенціалу.

Між адгезивним потенціалом *S. aureus* і *P. aeruginosa* та їх біоплівкоутворюючою активністю існувала пряма кореляційна залежність, $r_s = 0,836$ ($p < 0,001$) і $r_s = 0,952$ ($p < 0,001$) відповідно.

Біоплівкоутворюючі властивості патобіонтів, асоційованих з МВ.

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур *S. aureus* та *P. aeruginosa*, отриманих від дітей хворих на МВ, показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки. При цьому 53,6% ізолятів *S. aureus* мали середню ефективність біоплівкоутворення, а 17,9% – високу. Для *P. aeruginosa* ці показники відповідно становили 35,7% і 42,9%.

Аналіз швидкості біоплівкоутворення *S. aureus* в закритій системі показав, що через 6 год від початку досліду кількість життєздатних клітин становить 4,41 (0,07) lg/мл. Але на кінець 1-ї доби культивування мікробне навантаження складає 8,01 (0,095) lg КУО/мл. Починаючи з 2-ї доби культивування кількість мікробних клітин на поверхні полістиролового планшету мала тенденцію до зниження – 7,46 (0,14) КУО lg/мл. Суттєве зменшення мікробного навантаження, в порівнянні з кінцем 1-ї доби досліду, відмічали через 72 год – зменшення відбулося в 12 разів, $p = 0,028$.

Формування біоплівок клінічними ізолятами *S. aureus*, отриманими від дітей хворих на МВ, мало стадійний та три-направлений характер. На кінець 2-ї доби культивування відбулося суттєве накопичення бактеріального матриксу, біоплівка була складно організованою, все ще зберігала пористу структуру, але містила мікроколонії, в яких візуально вже не можна було виокремити мікробні клітини. На кінець 3-ї доби культивування і в подальшому мікроархітектура біоплівки під світловим мікроскопом мала вигляд моношару.

На відміну від *S. aureus*, формування біоплівки *P. aeruginosa* відбувалося дещо швидше. Протягом перших 12 год досліду було накопичено 66% загальної біомаси – 6,0 (0,250) lg/мл. До кінця 1-ї доби культивування продовжувалося накопичення біомаси, через 24 год мікробне навантаження складало 9,09 (0,170) lg КУО/мл. Після 24 год динаміка кількості життєздатних бактеріальних клітин залишалася стабільною, суттєве зменшення кількості КУО відмічали на кінець 96-доби досліду, коли втрата мікробного навантаження становила 36,42% ($p = 0,04$).

Процес утворення біоплівки клінічними ізолятами *P. aeruginosa* був також був стадійним, багатоцентровим і вирізнявся швидшим, в порівнянні зі *S. aureus*, накопиченням біомаси зі значною питомою вагою полісахаридного матриксу. Утворення мікроколоній прослідковувалося вже під час перших 24 год дослідів. На початкових етапах відмічали появу відособлених острівців-конгломератів, які в подальшому зливалися у більші за розмірами та щільніші структури. На кінець 1-ї доби дослідження можна було побачити макроскопічно сформовану плівку на границі рідина-повітря. Мікроскопічно – пористу тривимірну структуру зі складною архітектонікою та суттєвим накопиченням матриксу, в якому складно вирізнити окремі мікробні клітини. Пориста структура біоплівки ущільнилася протягом наступної доби культивування, продовжувалося накопичення маси біоматриксу. Після 72 год біоплівка являла собою щільну замкнену структуру з рясними викидами планктонних клітин на дистальних ділянках.

Антагонізм пробіотичних культур відносно патобіонтів асоційованих з МВ у дітей. Аутосимбіонти *A. viridans* мали виражений антагоністичний потенціал проти опортуністів та патогенів, виділених з дихальних шляхів дітей, хворих на МВ ($p < 0,001$). Розмір зон затримки росту зумовлених *A. viridans* становив 14,0 (0,8) мм – для *S. aureus*, 6,5 (1,75) мм – для *P. aeruginosa*, 11,5 (0,5) мм – для *K. pneumoniae*, 12,5 (0,98) мм – для *E. coli*, 14 (1,09) мм – для *C. albicans*. НФГНМО виявилися найбільш резистентними до дії пробіотичної культури *Aerococcus*. При порівнянні антагоністичного потенціалу аутосимбіонтів *A. viridans* та музейної культури *A. viridans* 167 встановлено, що ендогенна мікробіота є більш активною: різниця середнього зони затримки росту *S. aureus* становила 2 мм ($p = 0,04$), *E. coli* та *K. pneumoniae* – 3 мм ($p = 0,04$). Такі результати підтверджують гіпотезу про те, що в полімікробність в дихальних шляхах при МВ справляє селективний вплив на патогенів та коменсалів, що їх населяють. А отже, стимуляція ендогенної мікробіоти потенційно може бути одним з перспективних напрямків супутньої терапії МВ.

Мікроорганізм *B. clausii* також мав сильний та помірний антагоністичний потенціал проти опортуністів та патогенів, виділених з дихальних шляхів дітей, хворих на МВ ($F=18,50$; $p < 0,001$). Затримка росту *S. aureus* складала 12,1(1,64) мм,

P. aeruginosa – 8,6(0,6) мм, *K. pneumoniae* – 12 (2,4) мм, *E. coli* – 9,6 (0,98) мм, *C. albicans* – 15 (0,90) мм. При вивченні відстроченого антагонізму в дослідах з *B. clausii* отримано результати подібні до аутосимбіонтних ізолятів ($r_s = 0,77$; $p < 0,01$) та музейного штаму *A. viridans* ($r_s = 0,65$; $p < 0,05$). Але середнє значення зони затримки росту *E. coli* в досліді з аутосимбіонтами *A. viridans* перевищувало результат з *B. clausii* на 2 мм, $p = 0,04$.

Отже, патогени, що колонізують нижні дихальні шляхи дітей, хворих на МВ, наділені високими вірулентними властивостями – здатні набувати нових морфотипів, що дозволяє уникати дії ефекторів імунної системи, механічного кліренсу, антибіотиків, а також зумовлювати складнощі діагностики. Разом з тим, продукція біоплівки та розвиток стійкості до протимікробних засобів призводять в кінцевому наслідку до розвитку хронічної інфекції та неможливості її ерадикації. Пробіотичні мікроорганізми, здається, мають хороший потенціал в якості ад'ювантів до основного лікування [111, 112], при цьому використання аутосимбіонтів може мати більш перспективні наслідки.

РОЗДІЛ 5

РОЛЬ ФАКТОРІВ НЕСПЕЦИФІЧНОГО
ІМУННОГО ЗАХИСТУ В ПАТОГЕНЕЗІ МУКОВІСЦИДОЗУ У ДІТЕЙ

Патогномонічні зміни в дихальних шляхах при МВ полягають в порушенні мукоциліарного кліренсу з обструкцією в'язким слизом, що створює передумови для подальшої бактеріальної колонізації. Ключова роль в патогенезі МВ належить мікробному фактору, зокрема хронічній інфекції *P. aeruginosa*. Проте існують докази того, що запальний процес розвивається задовго до інфікування та є фактором, що вказує на додатково наслідуване ураження вродженої імунної відповіді [6, 89, 100].

Людські β -дефензини та кателіцидин є двома принциповими сімействами АМП, які експресуються епітеліальними клітинами тіла людини та нейтрофілами. Людський hBD-2 є індукцибельним пептидом з відомою активністю проти грам-негативних патогенів. Кателіцидин LL-37 – це мажорний білок нейтрофільних гранул з властивостями синергічними до дефензинів. Засновуючись на їх захисних прозапальних властивостях можна очікувати, що АМП відіграють одну з ключових ролей в патогенезі хвороби легень при МВ [84].

5.1 Концентрація hBD-2 та hCAP-18/LL-37 в мокротинні при МВ

В дослідженні прийняли участь 17 дітей віком від 7 років 5 місяців до 17 років 9 місяців, медіана віку на початку дослідження 12,9 (10,8; 15,8) років. Вихідні дані пацієнтів наведені в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Показники неспецифічного імунітету у дітей з МВ (n = 17)

N п/п	Вік	hBD-2, пг/мл	hCAP-18/ LL-37, нг/мл	Загальне число клітин/ 10 ⁶ /мл	Відносна кількість нейтрофілів, %	Pa
1	12р 3м	811,08	32,21	154	88,0	1
2	8р 6м	302,1	19,14	92	59,0	1
3	16р 3м	64,01	4,48	28	37,0	0
4	7р 5м	813,61	17,22	122	10,0	1
5	15р 1м	729,05	35,98	148	76,0	1
6	15р 1м	72,57	4,46	31	34,0	0
7	8р 5м	82,64	6,69	33	39,0	1
8	9р 6м	92,01	6,92	33	38,0	1
9	16р 5м	102,83	5,18	46	43,0	0
10	14р 6м	236,11	6,24	53	44,0	1
11	11р 4м	784,32	5,48	82	42,0	0
12	17р 0м	664,23	6,28	51	41,0	1
13	11р 9м	184,03	7,14	64	49,0	0
14	17р 9м	82,11	9,74	71	50,0	0
15	15р 8м	416,67	6,48	52	42,0	0
16	10р 8м	368,06	3,76	15	10,0	0
17	11р 3м	525,64	3,24	14	10,0	0

Від учасників було відібрано 17 зразків мокротиння. Мукозальні протимікробні пептиди були виявлені в респіраторному секреті усіх дітей задіяних у дослідженні, і їх рівень не корелював з віком учасників ($r_s = -0,25$, $p > 0,1$ – дефензин hBD-2; $r_s = -0,13$, – кателіцидин hCAP-18/LL-37 ($p > 0,1$)).

Концентрація hBD-2 вар'ювала від 64,01 до 813,61 пг/мл, медіана концентрації даного дефензину 302,10 (92,01; 664,23) пг/мл. Концентрація кателіцидину hCAP-

18/LL-37 була в межах 3,24-35,98 нг/мл, медіана 6,48 (5,18; 9,74) нг/мл. Ми не виявили достовірної кореляції між рівнями визначених АМП – hBD-2 та hCAP-18/LL-37 ($r_s = 0,32$; $p > 0,05$).

Враховуючи, що загально доступна інформація про рівень різних за походженням пептидів носить епізодичний характер і суттєво різниться в залежності від методики визначення [93, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102], для якісного аналізу отриманих результатів були використані наступні рекомендації виробника [94, 95]:

- hBD-2: низький 180,04 (12,46) пг/мл, середній 341,12 (17,5) пг/мл, високий 1735 (57,26) пг/мл;
- hCAP-18/LL-37: низький 4,99 (0,31) нг/мл, середній 11,72 (0,48) нг/мл, високий 45,29 (1,6) нг/мл.

Тож в нашому дослідженні в мокротинні дітей з МВ концентрації hBD-2 та hCAP-18/LL-37 сягали середніх значень, відповідно до рекомендацій виробника.

5.2 Взаємозв'язок характеру запалення в дихальних шляхах з концентрацією протимікробних пептидів та мікробною колонізацією

Між поточним статусом, позитивним на інфекцією *P. aeruginosa*, та рівнем hCAP-18/LL-37 був прямий помірний кореляційний зв'язок ($r_s = 0,63$; $p < 0,01$). При аналізі кореляції з hBD-2 достовірного зв'язку не виявлено ($r_s = 0,34$; $p > 0,05$). Окрім того, при аналізі характеру інфільтрації в дихальних шляхах, не встановлено характерного взаємозв'язку з виключно нейтрофільним характером запалення ($r_s = 0,27$; $p > 0,05$) та поточним статусом, позитивним на інфекцією *P. aeruginosa*, що підтверджує роль полімікробності в патогенезі захворювання легень при МВ.

Рівень антимікробних пептидів корелював з клітинними маркерами запалення в легенях. Зі збільшенням щільності клітинної інфільтрації та відносної кількості нейтрофілів також збільшувалась концентрація hCAP-18/LL-37 (рис. 5.1), сила зв'язку між ознаками висока. Окрім того, існувала також залежність середньої сили між рівнем hBD-2 та загальною щільністю клітинної інфільтрації ($r_s = 0,553$, $p < 0,05$), але не за рахунок нейтрофілів ($r_s = 0,12$, $p > 0,05$).

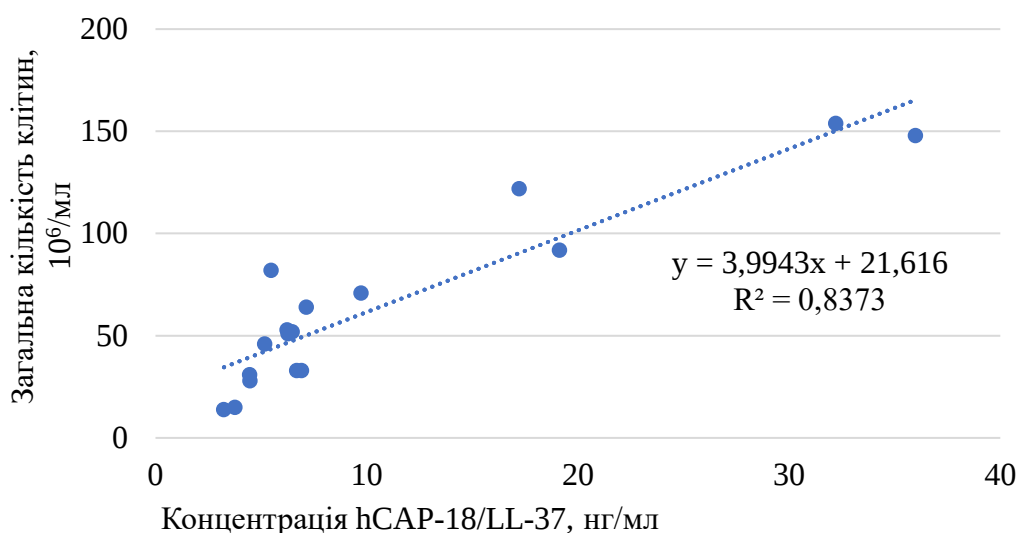


Рис. 5.1 Кореляція рівня hCAP-18/LL-37 з загальним числом клітин в мокротинні дітей з МВ ($r_s = 0,85$, $p < 0,001$)

5.3 Узагальнення результатів дослідження

Результати нашого дослідження свідчать про можливість визначення АМП hBD-2 та LL-37/hCAP-18 у мокротинні дітей хворих на МВ. Концентрації АМП у цьому дослідженні були більшими, ніж описано раніше при інших патологіях та у здорових індивідуумів [96, 99, 100, 101, 102]. Концентрація hBD-2 вар'ювала від 64,01 до 813,61 пг/мл, медіана концентрації даного дефензину 302,10 (92,01; 664,23) пг/мл. Концентрація кателіцидину hCAP-18/LL-37 була в межах 3,24-35,98 нг/мл, медіана 6,48 (5,18; 9,74) нг/мл. Ми не виявили достовірної кореляції між рівнями визначених АМП hBD-2 та hCAP-18/LL-37 ($r_s = 0,32$; $p > 0,05$).

Концентрація АМП позитивно корелювала з клітинними маркерами місцевого запалення, зокрема з загальною щільністю клітинної інфільтрації і відносною кількістю нейтрофілів. І навпаки, рівень hBD-2 не корелював з відносною кількістю нейтрофілів у зразку. Подібні результати були описані *Christiane I.-U. Chena та ін.* (2010) при аналізі БАЛ [96].

Ми знайшли кореляцію між рівнем hCAP-18/LL-37 та колонізацією *P. aeruginosa*. На цьому етапі наші результати співзвучні з даними *Xiao W та ін.* [97],

які наголошують на концентрація-залежній активності фагоцитозу та внутрішньоклітинного процесингу *P. aeruginosa*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі розв'язана важлива проблема сучасної медицини щодо мікробіологічного моніторингу при муковісцидозі у дітей і створено методичні рекомендації щодо мікробіологічних аспектів медичного супроводу.

За результатами роботи зроблено наступні висновки:

1. Респіраторний мікробіом дітей з МВ включав таких патогенів, як *S. aureus* та *H. influenzae*, але також НФГНМО, зокрема *B. ceracia complex*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, а також гриби роду *Aspergillus spp.* Видовий склад коменсалів дихальних шляхів був представлений коагулаза-негативними представниками роду *Staphylococcus*, а також *Streptococcus spp.*, *Aerococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Neisseria spp.* Видовий склад коменсалів, на відміну від патобіонтів, змінювався з віком зворотно пропорційно. НФГНМО починали свій вплив в ранньому дошкільному віці, роль збудників мала достовірну вік-залежну прогресію, $p < 0,001$. При чому поширеність *P. aeruginosa* у віці від 2 до 12 років складала 23,0-28,6%, а у віці старше 15 років – 64,9% ($p < 0,001$). Інфекція *S. aureus* мала однакову поширеність в усіх вікових групах.
2. Мікробіом носової порожнини був збіднілим та представленим лише кількома таксономічними одиницями, зокрема *Staphylococcus spp.* (79,1%) та родом *Corynebacterium*. Серед культур з даної добре аерованої ніші не було облигатних анаеробів, а також представників *Enterobacterales*. На відміну від зразків з носоглотки, з орофарингеальних зразків та мокротиння виділяли *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella spp.*, *Burkholderia ceracia complex*, а також представників *Enterobacterales* ($p > 0,05$), але мазки були багаті на супутню мікробіоту, зокрема коменсалів ротової порожнини.
3. Здебільшого отримані культури мали типові культуральні, морфологічні та біохімічні характеристики. Проте серед усіх ізолятів *S. aureus* 11,1% мали фенотип МКФ. Ауксотрофія з'являлася на фоні лікування антибіотиками і при ко-інфекції з *P. aeruginosa* ($p < 0,001$). Частка мукоїдів *P. aeruginosa*

- становила 27,2% ($n = 28$) від усіх ізолятів, МКФ – 5,8% ($n = 6$). Виділення грибів роду *Aspergillus* було пов'язане з присутністю *P. aeruginosa* ($p < 0,001$).
4. Культури *P. aeruginosa* та *S. aureus*, отримані від дітей хворих на муковісцидоз, володіли середніми та високими адгезивними властивостями. І, відповідно, середньою та високою ефективністю біоплівкоутворення ($p < 0,05$). Утворення біоплівок було стадійним, зріла плівка була сформована вже на кінець 1-ї доби культивування.
 5. Загалом *S. aureus* показав задовільні показники хіміотерапевтичної чутливості, проте насторожує виділення MRSA в дитячому віці, адже доведено, що успішна антибактеріальна терапія є важливим прогностичним фактором
 6. Чутливість до антибіотиків у *P. aeruginosa* була варіабельною. Найбільшу резистентність мікроорганізм показував до пеніцилінів – чутливість становила 62,1%. Мукоїди були більш стійкими до β -лактамів ($p < 0,01$). Насторожує поява ізолятів стійких до цефалоспоринов, фторхінолонів та карбапенемів.
 7. Аутосимбіоти *A. viridans* та музейний штам 167, а також спороутворюючі палички *B. clausii* мали високий антагоністичний потенціал проти грибів роду *Candida*, середній – проти *S. aureus* та представників сімейства *Enterobacteriaceae*. Особливо звертає на себе увагу більш висока антагоністична активність аутосимбіотів *A. viridans* відносно аутопатогенів. Відповідно, аутопробіотики можуть розглядатися, як ад'ювантні ресурси для відновлення коменсального компоненту респіраторного мікробіому дітей хворих на муковісцидоз.
 8. Рівень антимікробних пептидів корелював з клітинними маркерами запалення в легенях. Зі збільшенням щільності клітинної інфільтрації та відносної кількості нейтрофілів також збільшувалась концентрація hCAP-18/LL-37, сила зв'язку між ознаками висока. Окрім того, існувала також залежність середньої сили між рівнем hBD-2 та загальною щільністю клітинної інфільтрації. Динаміка показників неспецифічного імунітету

в залежності від мікробного профілю дихальних шляхів та щільності і типу клітинної інфільтрації відображає активність запального процесу в легенях може бути використана лікарями-клініцистами при плануванні протизапальної терапії при муковісцидозі у дітей.

Тож, респіраторний мікробіом дітей з муковісцидозом є зміненим і містить патогенів зі зміненими вірулентними властивостями. Стандартна протимікробна терапія, з одного боку, є можливістю контролю колонізації, але з іншого – сприяє селекції мультирезистентних клонів. Пробіотичні мікроорганізми є багатообіцяючою перспективою за рахунок прямої антагоністичної дії та стимуляції колонізаційної резистентності. Інтенсивність запалення в дихальних шляхах може бути контрольоване з використанням маркерів неспецифічного імунного захисту, зокрема hBD-2 і hCAP-18/LL-37. Проведення рутинного моніторингу стану респіраторного тракту є запорукою своєчасного виявлення нових властивостей клонів, що колонізують дихальні шляхи при муковісцидозі (ауксотрофна модифікація, мукоїдна трансформація, хіміотерапевтична резистентність) та визначення рівня локального запалення є інформацією для дії з перспективою більш ефективного та своєчасного етіотропного впливу.

Ці висновки наголошують на важливості комунікації між клінічними мікробіологами та клініцистами, що задіяні в лікуванні дітей з муковісцидозом. Така співпраця була б корисною для вибору оптимальної тактики лікування та попередження подальшого прогресування патологічного процесу в легенях, а отже, покращення якості та середньої очікуваної тривалості життя.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Мікробіологічний моніторинг стану дихальних шляхів є важливим аспектом в наданні медичної допомоги дітям з МВ. Результат мікробіологічного дослідження має враховуватися при поточній та щорічній оцінці стану легень. Мікробіологічне дослідження має проводитися у лабораторії з дотриманням стандартів якості, внутрішнього та зовнішнього аудиту. Спеціаліст з досвідом роботи з патогенами від хворих на МВ має бути включений в МДК, що надає медичну допомогу пацієнтам. Спеціаліст може мати освіту клінічного мікробіолога або лікаря-бактеріолога або лікаря-інфекціоніста з досві.

Мікробіологічний моніторинг при МВ є одним з ключових аспектів медичного супроводу і має проводитися з використанням найширшого можливого спектру поживних середовищ для виділення усіх максимально можливих патобіонтів, асоційованих з захворюванням.

При роботі з матеріалом з дихальних шляхів пацієнтів з МВ необхідно звертати увагу на морфотипи мікрорганізмів не властиві загальній популяції, зокрема МКФ та мукоїдну трансформацію.

При плануванні антибактеріальної терапії при МВ лікарям-клініцистам брати до уваги локальний профіль хіміотерапевтичної чутливості.

Використанням пробіотичних мікроорганізмів має розглядатися в комплексному лікуванні пацієнтів з МВ в якості ад'ювантної терапії.

Динаміка рівня hBD-2 та кателіцидину hCAP-18/LL-37, а також типу та щільності клітинної інфільтрації, є маркером запалення в дихальних шляхах при МВ та може бути використана для його оцінки.

З врахуванням найкращих практик та свого власного досвіду 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. Дані методичні рекомендації детально висвітлені в додатку В та публікації «Степанський Д. О., Іщенко О. В., Кошова І. П. Методичні рекомендації з мікробіологічного супроводу дітей з муковісцидозом. Дніпро, 2022 – 44 с. DOI: 10.31612/guidelines-2022-6».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України. Міністерство охорони здоров'я України. Муковісцидоз. Адапована клінічна настанова, заснована на доказах [Інтернет]. 2016 [цитовано 2022 Листоп 15]; 165 с. Доступно: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2016_723_a-kn_mkvsz.pdf
2. Центр медичної статистики МОЗ України. Звітні форми системи МОЗ [Інтернет]. 2021 [цитовано 2022 Листоп 15]; Звіт про надання медико-генетичної допомоги, форма №49 (табл. 2350): F492500. Доступно: <http://medstat.gov.ua/ukr/statdanMMXI-X.html>
3. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn screening for CF across the globe — Where is it worthwhile? *Int J Neonatal Screen*. 2020;6:18. DOI: [10.3390/ijns6010018](https://doi.org/10.3390/ijns6010018)
4. Scotet V, L'Hostis C, Férec C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery. *Genes (Basel)*. 2020;11(6):589. DOI: [10.3390/genes11060589](https://doi.org/10.3390/genes11060589)
5. Hatziagorou E, Orenti A, Drevinek P, Kashirskaya N, Mei-Zahav M, De Boeck K. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis-data from the European cystic fibrosis society patient registry. *J Cyst Fibros*. 2020;19(3):376-83. DOI: [10.1016/j.jcf.2019.08.006](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.08.006)
6. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 2015;14(4):419-30. DOI: [10.1016/j.jcf.2015.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.03.003)
7. Абатуров ОЄ, Крючко ТО, Леженко ГО, Завгородня НЮ. Антимікробні пептиди та протеїни респіраторного тракту, діагностична значущість та терапевтичні можливості. Харків: Планета-Принт; 2018. 496 с.
8. Vilenskyi Y, Bordiy T, Shvaratska O, Bolbot Y. The content of antimicrobial peptides—human β -defensin 2 and cathelicidin—in the secretion of the mucous membrane of the upper respiratory tract of children with bronchial asthma and

- allergic rhinitis. *Pediatrica Polska-Polish J of Paediatrics*. 2021;96(1):22-30. DOI: [10.5114/polp-.2021.104825](https://doi.org/10.5114/polp-.2021.104825)
9. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги. Муковісцидоз. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 723 від 15.07.2016. 2016 [цитовано 2022 Листоп 15]; 72 с. Доступно: http://dec.gov.ua/wp-content/uploads/images/dodatki/2016_723_Mykoviscidoz/2016_723_-_YKPMd_Mkvsz.pdf
 10. Omusu SK, Morrow BM, White D, Klugman S, Vanker A, Gray D, et al. Cystic Fibrosis in Black African Children in South Africa: A Case Control Study. *J Cyst Fibros*. 2020 Jul;19(4):540-5. DOI: [10.1016/j.jcf.2019.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.09.007)
 11. Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, Jung A, van Rens J. ECFSPR Annual Data Report 2018. European Cystic Fibrosis Society [Internet]. Karup. Denmark; 2020; version 1.4 [cited 2022 Nov 15]. 175 p. Available from: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSP-R_Report_2018_v1.4.pdf
 12. Orenti A, Zolin A, Jung A, van Rens J, et al. ECFSPR Annual Report 2019. European Cystic Fibrosis Society [Internet]. Karup. Denmark; 2021; version 1.0 [cited 2022 Nov 15]. 163 p. Available from: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report_2019-v1_16Feb2022.pdf
 13. Orenti A, Zolin A, Jung A, van Rens J, et al. ECFSPR Annual Report 2020. European Cystic Fibrosis Society [Internet]. Karup. Denmark; 2022; version 1.0 [cited 2022 Nov 15]. 163 p. Available from: http://www.ecfs.eu/sites/default/files/ECFS-PR_Report_2020_v1.0%20%2807Jun2022%29_website.pdf
 14. McKone EF, Ariti C, Jackson A, Zolin A, Carr SB, Orenti A, et al. Survival estimates in European cystic fibrosis patients and the impact of socioeconomic factors: a retrospective registry cohort study. *Eur Respir J*. 2021;58(3):2002288. DOI [10.1183/-13993003.02288-2020](https://doi.org/10.1183/-13993003.02288-2020)

15. Keogh RH, Seaman SR, Barrett JK, Taylor-Robinson D, Szczesniak R. Dynamic Prediction of Survival in Cystic Fibrosis: A Landmarking Analysis Using UK Patient Registry Data. *Epidemiology*. 2019;30:29-37. DOI: [10.1097/EDE.0000000000000920](https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000920)
16. Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, et al. ERS/ECFS Task Force on Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J*. 2015;46(1):133-41. DOI: [10.1183/09031-936.00196314](https://doi.org/10.1183/09031-936.00196314)
17. Stephenson AL, Stanojevic S, Sykes J, Burgel PR. The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. *Presse Med*. 2017;46:e87-e95. DOI: [10.1016/j.lpm.2017.04.012](https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.04.012)
18. Stanojevic S, Sykes J, Stephenson AL, Aaron SD, Whitmore GA. Development and External Validation of 1- And 2-year Mortality Prediction Models in Cystic Fibrosis. *Eur Respir J*. 2019;54:1900224. DOI: [10.1183/13993003.00224-2019](https://doi.org/10.1183/13993003.00224-2019)
19. Spoonhower KA, Davis PB. Epidemiology of Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*. 2016;37(1):1-8. DOI: [10.1016/j.ccm.2015.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.10.002)
20. Crull MR, Ramos KJ, Caldwell E, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Goss CH. Change in *Pseudomonas aeruginosa* prevalence in cystic fibrosis adults over time. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):176. DOI: [10.1186/s12890-016-0333-y](https://doi.org/10.1186/s12890-016-0333-y)
21. Rutter WC, Burgess DR, Burgess DS. Increasing Incidence of Multidrug Resistance Among Cystic Fibrosis Respiratory Bacterial Isolates. *Microb Drug Resist*. 2017;23(1):51-5. DOI: [10.1089/mdr.2016.0048](https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0048)
22. Fothergill JL, Walshaw MJ, Winstanley C. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur Respir J*. 2012;40(1):227-38. DOI: [10.1183/09031936.00204411](https://doi.org/10.1183/09031936.00204411)
23. Workentine M, Poonja A, Waddell B, Duong J, Storey DG, Gregson D, et al. Development and Validation of a PCR Assay To Detect the Prairie Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54(2):489-91. DOI: [10.1128/JCM.02603-15](https://doi.org/10.1128/JCM.02603-15)

24. Acosta N, Waddell B, Heirali A, Somayaji R, Surette MG, Workentine ML, et al. Cystic Fibrosis Patients Infected With Epidemic *Pseudomonas aeruginosa* Strains Have Unique Microbial Communities. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:173. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00173
25. Jeukens J, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Allard C, Barbeau J, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Population among Cystic Fibrosis Patients in Quebec, Canada: a Disease Hot Spot without Known Epidemic Isolates. *J Clin Microbiol*. 2019;57(6):e02019-18. DOI: 10.1128/JCM.02019-18
26. Moore MP, Lamont IL, Williams D, Paterson S, Kukavica-Ibrulj I, Tucker NP, et al. Transmission, adaptation and geographical spread of the *Pseudomonas aeruginosa* Liverpool epidemic strain. *Microb Genom*. 2021;7(3):mgen000511. DOI: 10.1099/mgen.0.000511
27. Kevat A, Carzino R, Massie J, Harrison J, Griffiths AL. Elimination of Australian epidemic strain (AES1) *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(11):1498-503. DOI: 10.1002/ppul.24173
28. Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, Drevinek P, Foweraker J, Havermans T, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre. *J Cyst Fibros*. 2014;13(Suppl 1):S3-22. DOI: 10.1016/j.jcf.2014.03.009
29. Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00019-18. DOI: 10.1128/CMR.00019-18
30. Somayaji R, Waddell B, Workentine ML, Surette MG, Brager NP, Rabin HR, et al. Infection control knowledge, beliefs and behaviours amongst cystic fibrosis patients with epidemic *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Pulm Med*. 2015;15:138. DOI: 10.1186/s12890-015-0116-x
31. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):821-30. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03237.x

32. van Gool K, Norman R, Delatycki MB, Hall J, Massie J. Understanding the costs of care for cystic fibrosis: an analysis by age and health state. *Value Health*. 2013;16(2):345-55. DOI: 10.1016/j.jval.2012.12.003
33. Gentzsch M, Mall MA. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest*. 2018;154(2):383-93. DOI: 10.1016/j.chest.2018.04.036
34. Martin SL, Saint-Criq V, Hwang TC, Csanády L. Ion channels as targets to treat cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*. 2018;17(2S):S22-S27. DOI: 10.1016/j.jcf.2017.10.006
35. Spoonhower KA, Davis PB. Epidemiology of Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*. 2016;37(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ccm.2015.10.002
36. Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(6):727-36. DOI: 10.1055/s-0039-1698464
37. Burns JL, Rolain JM. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: can we simplify the complexity? *J Cyst Fibros*. 2014;13(1):1-9. DOI: 10.1016/j.jcf.2013.09.004
38. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med*. 2014;34(2):197-217. DOI: 10.1016/j.cll.2014.02.001
39. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):174. DOI: 10.1186/s12890-016-0339-5
40. Li C, Wu Y, Riehle A, Ma J, Kamler M, Gulbins E, et al. *Staphylococcus aureus* Survives in Cystic Fibrosis Macrophages, Forming a Reservoir for Chronic Pneumonia. *Infect Immun*. 2017;21:85(5):e00883-16. DOI: 10.1128/IAI.00883-16
41. Melter O, Radojevič B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010;55(6):548-58. DOI: 10.1007/s12223-010-0089-3
42. Masoud-Landgraf L, Zarfel G, Kaschnigg T, Friedl S, Feierl G, Wagner-Eibel U, et al. Analysis and Characterization of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Isolated From Cystic Fibrosis Patients in Austria. *Curr Microbiol*. 2016;2(5):606-11. DOI: 10.1007/s00284-016-0994-z

43. Orazi G, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* Alters *Staphylococcus aureus* Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection. *mBio*. 2017;8(4):e00873-17. DOI: 10.1128/mBio
44. Wolter DJ, Onchiri FM, Emerson J, Precit MR, Lee M, McNamara S, et al. Prevalence and clinical associations of *Staphylococcus aureus* small-colony variant respiratory infection in children with cystic fibrosis (SCVSA): a multicentre, observational study. *Lancet Respir Med*. 2019;7(12):1027-38. DOI: 10.1016/S2213-2600(19)30365-0
45. Malone JG. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect Drug Resist*. 2015;8:237-47. DOI: 10.2147/IDR.S68214
46. Briard B, Bomme P, Lechner BE, Mislin GL, Lair V, Prévost MC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Sci Rep*. 2015;5:8220. DOI: 10.1038/srep08220
47. Smith K, Rajendran R, Kerr S, Lappin DF, Mackay WG, Williams C, et al. *Aspergillus fumigatus* enhances elastase production in *Pseudomonas aeruginosa* co-cultures. *Med Mycol*. 2015;53(7):645-55. DOI: 10.1093/mmy/myv048
48. Chatterjee P, Sass G, Swietnicki W, Stevensen DA. Review of Potential *Pseudomonas* Weaponry, relevant to the *Pseudomonas-Aspergillus* interplay, for the Mycology community. *J Fungi*. 2020;6(81):22. DOI: 10.3390/jof6020081
49. Ferreira JA, Penner JC, Moss RB, Haagensen JA, Clemons KV, Spormann AM, et al. Inhibition of *Aspergillus fumigatus* and its biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the source, phenotype and growth conditions of the bacterium. *PLoS ONE*. 2015;10:e0134692. DOI: 10.1371/journal.pone.0134692
50. Keown K, Reid A, Moore JE, Taggart CC, Downey DG. Coinfection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2020;29:200011. DOI: 10.1183/16000617.0011-2020
51. Garcia-Clemente M, de la Rosa D, Máiz L, Girón R, Blanco M, Oliveira C, et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* Infection on Patients with Chronic

- Inflammatory Airway Diseases. *J Clin Med.* 2020;9(12):3800. DOI: 10.3390/jcm9123800
52. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today.* 2019;24(1):350-9. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.07.003
 53. Zibek S, Soberón-Chávez G. Overview on Glycosylated Lipids Produced by Bacteria and Fungi: Rhamno-, Sophoro-, Mannosylerythritol and Cellobiose Lipids. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2022;181:73-122. DOI: 10.1007/10_2021_200
 54. Huang H, Shao X, Xie Y, Wang T, Zhang Y, Wang X, et al. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun.* 2019;10:2931. DOI: [10.1038/s41467-019-10778-w](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10778-w)
 55. Reen FJ, Phelan JP, Woods DF, Shanahan R, Cano R, Clarke S, et al. Harnessing Bacterial Signals for Suppression of Biofilm Formation in the Nosocomial Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2016;7:2074. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02074
 56. Popat R, Harrison F, da Silva AC, Easton SA, McNally L, Williams P, et al. Environmental modification via a quorum sensing molecule influences the social landscape of siderophore production. *Proc Biol Sci.* 2017;284(1852):20170200. DOI: 10.1098/rspb.2017.0200
 57. Lin J, Cheng J, Wang Y, Shen X. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:230. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00230
 58. Nazik H, Sass G, Ansari SR, Ertekin R, Haas H, Déziel E, et al. Novel intermicrobial molecular interaction: *Pseudomonas aeruginosa* Quinolone Signal (PQS) modulates *Aspergillus fumigatus* response to iron. *Microbiology (Reading).* 2020;166(1):44-55. DOI: 10.1099/mic.0.000858

59. Malhotra S, Hayes DJ, Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(3):e00138-18. DOI: 10.1128/CMR.00138-18
60. Sass G, Nazik H, Penner J, Shah H, Ansari SR, Clemons KV, et al. Studies of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Indicate Pyoverdine as the Central Factor in Inhibition of *Aspergillus fumigatus* Biofilm. *J Bacteriol.* 2017;200(1):e00345-17. DOI: 10.1128/JB.00345-17
61. Briard B, Mislin GL, Latgé JP, Beauvais A. Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Pulmonary Bacteria: Current State of the Field, New Data, and Future Perspective. *J Fungi (Basel).* 2019;5(2):48. DOI: 10.3390/jof5020048
62. Zheng H, Kim J, Liew M, Yan JK, Herrera O, Bok JW, et al. Redox metabolites signal polymicrobial biofilm development via the NapA oxidative stress cascade in *Aspergillus*. *Curr Biol.* 2015;25(1):29-37. DOI: 10.1016/j.cub.2014.11.018
63. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(7):821-30. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03237.x
64. Slinger BL, Deay JJ, Chandler JR, Blackwell HE. Potent modulation of the CepR quorum sensing receptor and virulence in a *Burkholderia cepacia* complex member using non-native lactone ligands. *Sci Rep.* 2019;9(1):13449. DOI: 10.1038/s41598-019-49693-x
65. Butt AT, Thomas MS. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Burkholderia* Species. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:460. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00460
66. Ganesh PS, Vishnupriya S, Vadivelu J, Mariappan V, Vellasamy KM, Shankar EM. Intracellular survival and innate immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. *Microbiol Immunol.* 2020;64(2):87-98. DOI: 10.1111/1348-0421.12762
67. Hassan AA, Coutinho CP, Sá-Correia I. *Burkholderia cepacia* Complex Species Differ in the Frequency of Variation of the Lipopolysaccharide O-Antigen

- Expression During Cystic Fibrosis Chronic Respiratory Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:273. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00273
68. Somprasong N, Yi J, Hall CM, Webb JR, Sahl JW, Wagner DM, et al. Conservation of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Pump-Mediated Antibiotic Resistance in *Burkholderia cepacia* Complex and *Burkholderia pseudomallei* Complex Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(9):e0092021. DOI: 10.1128/AAC.00920-21
 69. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax.* 2016;71(Suppl 1):i1-22. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-207360
 70. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Eur Respir J.* 2020;56(1):2000535. DOI: 10.1183/13993003.0-0535-2020
 71. NICE guideline [NG78]. Cystic fibrosis: diagnosis and management. Published 2017 Oct 25 [Internet]. 2022 [cited 2022 Nov 15]. 42 p. Available from: <http://www.nice.org.uk/guidance/ng78/resources-/cystic-fibrosis-diagnosis-and-management-pdf-1837640946373>
 72. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, Bryon M, Duff A, Flume P, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros.* 2014;13(Suppl 1):S23-42. DOI: 10.1016/j.jcf.2014.03.010
 73. López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. *Expert Rev Respir Med.* 2015;9(1):73-88. DOI: 10.1586/17476348.2015.995640
 74. Thi MT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8671. DOI: 10.3390/ijms21228671

75. Kovalchuk VP, Nazarchuk OA, Burkot VM, Fomina NS, Prokopchuk ZM, Dobrovanov O. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria. *Wiad Lek.* 2021;74(2):252-6.
76. Martin I, Waters V, Grasemann H. Approaches to Targeting Bacterial Biofilms in Cystic Fibrosis Airways. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):2155. DOI: 10.3390/ijms22042155
77. Абатуров ОЄ, Крючко ТО. Медикаментозний вплив на диспергування біоплівки. Амінокислоти та їх деривати. *Здоров'я дитини.* 2019;14(8):490-495. DOI: 10.22141/2224-0551.14.8.2019.190844
78. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020;84(3):e00026-19. DOI: 10.1128/MMBR.00026-19
79. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4657396. DOI: 10.1155/2018/4657396
80. Ganesh PS, Vishnupriya S, Vadivelu J, Mariappan V, Vellasamy KM, Shankar EM. Intracellular survival and innate immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. *Microbiol Immunol.* 2020;64(2):87-98. DOI: 10.1111/1348-0421.12762
81. Cieślík M, Bagińska N, Górski A, Jończyk-Matysiak E. Human β -Defensin 2 and Its Postulated Role in Modulation of the Immune Response. *Cells.* 2021;10(11):2991. DOI: 10.3390/cells10112991
82. Geitani R, Moubareck CA, Xu Z, Karam Sarkis D, Touqui L. Expression and Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Defense of Airway Mucosa: Potential Implication in Cystic Fibrosis. *Front Immunol.* 2020;11:1198. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01198

83. Cabak A, Hovold G, Petersson AC, Ramstedt M, Pålman LI. Activity of airway antimicrobial peptides against cystic fibrosis pathogens. *Pathog Dis.* 2020;78(7):taa048. DOI: 10.1093/femspd/ftaa048
84. Parducho KR, Beadell B, Ybarra TK, Bush M, Escalera E, Trejos AT, et al. The Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin 2 Inhibits Biofilm Production of *Pseudomonas aeruginosa* Without Compromising Metabolic Activity. *Front Immunol.* 2020;11:805. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00805
85. Meade KG, O'Farrelly C. β -Defensins: Farming the Microbiome for Homeostasis and Health. *Front Immunol.* 2019;9:3072. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03072
86. Sheehan G, Bergsson G, McElvaney NG, Reeves EP, Kavanagh K. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 Promotes the Growth of the Pulmonary Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2018;86(7):e00097-18. DOI: 10.1128/IAI.00097-18
87. Zhang QY, Yan ZB, Meng YM, Hong XY, Shao G, Ma JJ, et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Med Res.* 2021;8(48). DOI: 10.1186/s40779-021-00343-2
88. Simonin J, Bille E, Crambert G, et al. Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis [published correction appears in *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 17535]. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 6516. DOI: 10.1038/s41598-019-42751-4
89. Ramazi S, Mohammadi N, Allahverdi A, Khalili E, Abdolmaleki P. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. *Database (Oxford).* 2022;2022:baac011. DOI: 10.1093/database/baac011
90. Aarbiou J, Tjabringa GS, Verhoosel RM, Ninaber DK, White SR, Peltenburg LT, et al. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. *Inflamm Res.* 2006;55(3):119-27. DOI: 10.1007/s00011-005-0062-9
91. Rapala-Kozik M, Bochenska O, Zawrotniak M, Wolak N, Trebacz G, Gogol M, et al. Inactivation of the antifungal and immunomodulatory properties of human cathelicidin LL-37 by aspartic proteases produced by the pathogenic yeast

- Candida albicans*. *Infect Immun*. 2015;83(6):2518-30. DOI: 10.1128/IAI.00023-15
92. Hua MC, Chen CC, Liao SL, Yao TC, Tsai MH, Lai SH, et al. Increased fecal human beta-defensin-2 expression in preterm infants is associated with allergic disease development in early childhood. *World Allergy Organ J*. 2022;15(5):100633. DOI: 10.1016/j.waojou.2022.100633
 93. Xiao Z, Ding W, Wen C, Ge C, Liu L, Xu K, et al. Correlation between salivary HBD-2 and LL-37 expression levels with blood glucose and periodontal status in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Transl Res*. 2022;14(5):3286-91.
 94. Elabscience. Human LL-37(Antibacterial Protein LL-37) ELISA Kit: manual. [Internet]. [cited 2022 Nov 15]. Available from: https://www.elabscience.com/phuman_ll_37_antibacterial_protein_ll_37_elisa_kit-19823.html
 95. Elabscience. Human DEF β 2/DEFB2 (Defensin Beta 2) ELISA Kit: manual. [Internet]. [cited 2022 Nov 15]. Available from: https://www.elabscience.com/phuman_defbeta2_defb2_defensin_beta_2_elisa_kit-18658.html
 96. Chen CI, Schaller-Bals S, Paul KP, Wahn U, Bals R. Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004;3(1):45-50. DOI: 10.1016/j.jcf.2003.12.008
 97. Xiao W, Hsu YP, Ishizaka A, Kirikae T, Moss RB. Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest*. 2005;128(4):2316-26. DOI: 10.1378/chest.128.4.2316
 98. Dalcin D, Ulanova M. The Role of Human Beta-Defensin-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection in Cystic Fibrosis Patients. *Infect Dis Ther*. 2013;2(2):159-66. DOI: 10.1007/s40121-013-0015-5
 99. Cakir E, Torun E, Gedik AH, Umutoglu T, Aktas EC, Topuz U, et al. Cathelicidin and human β -defensin 2 in bronchoalveolar lavage fluid of children with

- pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014 Jun;18(6):671-5. DOI: 10.5588/ijtld.13.0831
100. Hiratsuka T, Mukae H, Iiboshi H, Ashitani J, Nabeshima K, Minematsu T, et al. Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax*. 2003;58(5):425-30. DOI: 10.1136/thorax.58.5.425
 101. Ross DJ, Cole AM, Yoshioka D, Park AK, Belperio JA, Laks H, et al. Increased Bronchoalveolar Lavage Human β -Defensin Type 2 in Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplantation. *Transplantation*. 2004;78(8):1222-4. DOI: 10.1097/01.tp.00-00137265.18491.75
 102. Ghosh SK, Gerken TA, Schneider M, Feng Z, McCormick TS, Weinberg A. Quantification of Human β -Defensin-2 and -3 in Body Fluids: Application for Studies of Innate Immunity. *Clinical Chemistry*. 2007;53(4):757-65, DOI: [10.1373/clinchem.2006.081430](https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.081430)
 103. Castagnola E, Cangemi G, Mesini A, Castellani C, Martelli A, Cattaneo D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in cystic fibrosis: a narrative review. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;58(3):106381. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106381
 104. Pascale R, Giannella M, Bartoletti M, Viale P, Pea F. Use of meropenem in treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2019;17(10):819-27. DOI: [10.1080/14787210.2019.1673731](https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1673731)
 105. Biagi M, Wu T, Lee M, Patel S, Butler D, Wenzler E. Searching for the Optimal Treatment for Metallo- and Serine- β -Lactamase Producing Enterobacteriaceae: Aztreonam in Combination with Ceftazidime-avibactam or Meropenem-vaborbactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(12):e01426-19. DOI: 10.1128/AAC.01426-19
 106. Garazzino S, Altieri E, Silvestro E, Pruccoli G, Scolfaro C, Bignamini E. Ceftolozane/Tazobactam for Treating Children With Exacerbations of Cystic

- Fibrosis Due to *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of Available Data. *Front Pediatr*. 2020;8:173. DOI: 10.3389/fped.2020.00173
107. Saffioti C, Barco S, Cangemi G, Mesini A, Casciaro R, Cresta F, et al. Ceftazidime plasma concentration in a patient with cystic fibrosis treated with ceftazidime/avibactam plus trimethoprim/sulfamethoxazole for *Burkholderia cepacia* recolonization. *J Chemother*. 2019;31(7-8):436-8. DOI: 10.1080/1120009X.2019.1671654
 108. Baek MS, Chung ES, Jung DS, Ko KS. Effect of colistin-based antibiotic combinations on the eradication of persister cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(4):917-24. DOI: 10.1093/jac/dkz552
 109. Bassetti M, Vena A, Russo A, Peghin M. Inhaled Liposomal Antimicrobial Delivery in Lung Infections. *Drugs*. 2020;80(13):1309-18. DOI: 10.1007/s40265-020-01359-z
 110. Carvalho FM, Teixeira-Santos R, Mergulhão FJ, Gomes LC. The Use of Probiotics to Fight Biofilms in Medical Devices: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*. 2020;9(1):27. DOI: 10.3390/microorganisms9010027
 111. Neri LC, Taminato M, Silva Filho LV. Systematic Review of Probiotics for Cystic Fibrosis Patients: Moving Forward. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;68(3):394-9. DOI: 10.1097/MPG.000000-0000002185
 112. Coffey MJ, Garg M, Homaira N, Jaffe A, Ooi CY. Probiotics for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;1(1):CD012949. DOI: 10.1002/14651858.CD012949.pub2
 113. Stepanskiy D, Krushinska T, Kremenchutsckyy G, Turlyun S, Koshevaya I, Val'chuk S, et al. Restoration of laboratory animal's normal microflora with induced dysbiosis. *Reports of Vinnytsia National Medical University*. 2018;22(2):276-9. DOI: [10.31393/reports-vnmedical-2018-22\(2\)-08](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-08)
 114. Batoni G, Maisetta G, Kaya E, Esin S. Lung-Directed Bacteriotherapy in Cystic Fibrosis: Could It Be an Option? *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(3):326. DOI: 10.3390/antibiotics11030326

115. Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, et al. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *mBio*. 2012;3(4):e00251-12. DOI: 10.1128/mBio.00251-12
116. Fangous MS, Alexandre Y, Hymery N, Gouriou S, Arzur D, Blay GL, et al. Lactobacilli intra-tracheal administration protects from *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in mice - a proof of concept. *Benef Microbes*. 2019;10(8):893-900. DOI: 10.3920/BM2019.0069
117. Fangous MS, Gosset P, Galakhoff N, Gouriou S, Guilloux CA, Payan C, et al. Priming with intranasal lactobacilli prevents *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in mice. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):195. DOI: 10.1186/s12866-021-02254-7
118. Strauss M, Mičetić-Turk D, Pogačar MŠ, Fijan S. Probiotics for the Prevention of Acute Respiratory-Tract Infections in Older People: Systematic Review. *Healthcare (Basel)*. 2021;9(6):690. DOI: 10.3390/healthcare-9060690
119. Tran DM, Tran TT, Phung TT. Nasal-spraying *Bacillus* spores as an effective symptomatic treatment for children with acute respiratory syncytial virus infection. *Sci Rep*. 2022;12:12402. DOI: 10.1038/s41598-022-16136-z
120. Stepanyi DO, Kremenchutsky GM, Chuyko VI, Koshova IP, Khomiak OV. Krushynska TY. Hydrogen peroxide production activity and adhesive properties of aerococci, isolated in women. *Annals of Mechnikov institute*. 2017;2:53-6. DOI: 10.5281/zenodo.803870
121. Степанський ДО, Кременчуцький ГМ, Чуйко ВІ, Турлюн СЯ, Крушинська ТЮ. Частота виявлення і кількісний вміст резидентних аерококів у різних відділахпологових шляхів вагітних жінок. *Вісн. пробл. біології і медицини*. 2017;3(2):33-6.
122. Степанський ДО, Кременчуцький ГМ, Кошова ІП. Доклінічне вивчення властивостей аутосимбіонтів людини *A. viridans*. *Мед. перспективи*. 2016;21(2):87-93.

123. Степанський ДО, Кременчуцький ГМ, Кошова ІП. Вивчення біологічної дії аутоштамів аерококів на моделях стафілококової інфекції. Мед. перспективи. 2017;22(2):78-85.
124. Stepanskyi DO, Kremenchutskyi GM, Koshova IP. Experimental study action autostrains *Aerococcus viridans* on the model *Pseudomonas* infection. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017;8(3):313-6. DOI: 10.15421/021749
125. Stepanskyi D, Koshova I, Khomiak O, Nefedov A. Study of autosymbiont aerococcus *viridans* adhesive properties on epithelial cells model. *Modern Science – Moderní věda*. 2017;2:129-33.
126. Stern M, Bertrand DP, Bignamini E, Corey M, Dembski B, Goss CH, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Quality Management in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014 May;13(Suppl 1):S43-59. DOI: 10.1016/j.jcf.2014.03.011
127. Denton M, Doherty C, Fowerake J, Govan J, Hall M, Isalska B, et al. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group. Cystic fibrosis is our focus. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. 1-st ed. [Internet]. 2010. [cited 2022 Nov 15]. 40 p. Available from: <https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/202012/Laboratory%20standards.pdf>
128. Fairweather NH, Jones FW, Harris SA, Deiros Collado M, Shayle A. Thriving alongside cystic fibrosis: Developing a grounded theory of empowerment in children and young people with cystic fibrosis during key life transitions. *Child Care Health Dev*. 2021;47(4):484-93. DOI: 10.1111/cch.12860
129. Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ, Brown RF, Bryson EA, Chambers MJ, et al. Cystic Fibrosis Foundation. Society for Healthcare Epidemiology of America. Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(Suppl 1):S1-S67. DOI: 10.1086/676882
130. Sermet-Gaudelus I, Mayell SJ, Southern KW; European Cystic Fibrosis Society (ECFS), Neonatal Screening Working Group. Guidelines on the early

- management of infants diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. *J Cyst Fibros.* 2010;9(5):323-9. DOI: 10.1016/j.jcf.2010.04.008
131. Lahiri T, Hempstead SE, Brady C, Cannon CL, Clark K, Condren ME, et al. Clinical Practice Guidelines From the Cystic Fibrosis Foundation for Preschoolers With Cystic Fibrosis. *Pediatrics.* 2016;137(4):e20151784. DOI: 10.1542/peds.2015-1784
 132. Castellani C, Duff AJ, Bell SC, Heijerman HG, Munck A, Ratjen F, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros.* 2018;17(2):153-78. DOI: 10.1016/j.jcf.2018.02.006
 133. Waters I, Wilcox P, Chilvers M, Young A, Kent S, Quon B, et al. Care guidelines specific to new acquisition of pulmonary bacteria: cystic fibrosis. 2018. 21 p.
 134. Alexander S, Alshafi K, Al-Yaghchi C, Anderson AK, BalfourLynn I, Bentley S, et al. Clinical guidelines: Care of children with cystic fibrosis. Royal Brompton Hospital. Paediatric Cystic Fibrosis Team. 8-th ed. 2020. 311 p.
 135. Hahn A, Whiteson K, Davis TJ, Phan J, Sami I, Koumbourlis AC, et al. Longitudinal Associations of the Cystic Fibrosis Airway Microbiome and Volatile Metabolites: A Case Study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:174. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00174
 136. Prattes J, Koidl C, Eigl S, Krause R, Hoenigl M. Bronchoalveolar lavage fluid sample pretreatment with Sputasol® significantly reduces galactomannan levels. *J Infect.* 2015;70(5):541-3. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.11.005
 137. Elborn JS, Perrett J, Forsman-Semb K, Marks-Konczalik J, Gunawardena K, Entwistle N. Efficacy, safety and effect on biomarkers of AZD9668 in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2012;40(4):969-76. DOI: 10.1183/09031936.00194611
 138. Elorde R, Limpin ME. The Accuracy of BronkoTest in Detecting Bacterial Infection in Patients With Chronic Lung Diseases. *Chest.* 2016;150(4):1241A. DOI: 10.1016/j.chest.2016.08.1353
 139. Eg KP, Thomas RJ, Masters IB, McElrea MS, Marchant JM, Chang AB. Development and validation of a bronchoscopically defined bronchitis scoring tool in children. *Pediatr Pulmonol.* 2020;55(9):2444-51. DOI: 10.1002/ppul.24924

140. Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J-L, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J. ESCMID: European manual of clinical microbiology. 1-st ed. 2012. 472 p.
141. Weiser R, Donoghue D, Weightman A, Mahenthiralingam E. Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *J Microbiol Methods*. 2014;99:8-14. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.01.010
142. Singh AK, Bhunia AK. Optical scatter patterns facilitate rapid differentiation of Enterobacteriaceae on CHROMagar™ Orientation medium. *Microb Biotechnol*. 2016;9(1):127-35. DOI: 10.1111/1751-7915.12323
143. Al Ahmar R, Kirby BD, Yu HD. Culture of Small Colony Variant of *Pseudomonas aeruginosa* and Quantitation of its Alginate. *J Vis Exp*. 2020;156. DOI: 10.3791/60466
144. Ishchenko O, Koshova I, Borysova I, Stepanyskiy D. Microbiological features of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract of children with cystic fibrosis. *Wiad Lek*. 2021;74(9 cz 1):2094-9.
145. Cipolla L, Rocca F, Armitano RI, Martinez C, Almuzara M, Faccone D, et al. Desarrollo y evaluación de una base de datos in house para la identificación rápida de *Burkholderia contaminans* por EM MALDI-TOF. *Rev Argent Microbiol*. 2019;51(3):255-8. DOI: 10.1016/j.ram.2018.09.001
146. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini MI, Lamas A, Máiz L, Cantón R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2012;11(1):59-62. DOI: 10.1016/j.jcf.2011.09.001
147. AbdulWahab A, Taj-Aldeen SJ, Ibrahim EB, Talaq E, Abu-Madi M, Fotedar R. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist*. 2015;8:83-8. DOI: 10.2147/IDR.S80341
148. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0 [Internet]. 2021 [cited 2022 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>

149. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Intrinsic resistance and unusual phenotypes. Expert rules. Version 3.3 [Internet]. 2021. [cited 2022 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
150. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Guidance Documents [Internet]. [cited 2022 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
151. Smith S, Waters V, Jahnke N, Ratjen F. Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 6 (6): CD009528. DOI: 10.1002/14651858-CD009528.pub5
152. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011;(47):2437. DOI: 10.3791/2437
153. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
154. Coffey BM, Anderson GG. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. In: Filloux A, Ramos JL, eds. *Pseudomonas Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana, New York; 2014, 1149, 631-641. DOI: [10.1007/978-1-4939-0473-0_48](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48)
155. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(Suppl 1):S1-25. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024
156. Wu X, Al Farraj DA, Rajaselvam J, Alkufeidy RM, Vijayaraghavan P, Alkubaisi NA, et al. Characterization of biofilm formed by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* DC-17 isolated from dental caries. *Saudi J Biol Sci*. 2020 Nov;27(11):2955-60. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.07.020

157. Трофіменко ЮЮ. Біологічні властивості мікрофлори, що колонізує ендотрахеальні інтубаційні трубки у відділеннях інтенсивної терапії [дисертація]. Вінниця; 2015. 127 с.
158. Dudek P, Grajek A, Kowalczewski J, Madycki G, Marczak D. Ultrasound frequency of sonication applied in microbiological diagnostics has a major impact on viability of bacteria causing PJI. *Int J Infect Dis.* 2020;100:158-63. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.08.038
159. Реброва О. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Медиа-Сфера; 2006. 312 с.
160. Рижов ОА, Пенкін ЮМ. Статистичні методи опрацювання результатів медично-біологічних досліджень. Магнолія 2006; 2022. 160 с.
161. Yadav SK, Singh S, Gupta R. *Biomedical Statistics. A Beginner's Guide.* 1-st ed. Springer, Singapore; 2019. 342 p.
162. Lamoureux C, Guilloux CA, Beauruelle C, Gouriou S, Ramel S, Dirou A, et al. An observational study of anaerobic bacteria in cystic fibrosis lung using culture dependant and independent approaches. *Sci Rep.* 2021;11:6845. DOI: [10.1038/s41598-021-85592-w](https://doi.org/10.1038/s41598-021-85592-w)
163. Thornton CS, Surette MG. Potential Contributions of Anaerobes in Cystic Fibrosis Airways. *J Clin Microbiol.* 2021;59(3):e01813-19. DOI: 10.1128/JCM.01813-19
164. Einarsson GG, Ronan NJ, Mooney D, McGettigan C, Mullane D, NiChroinin M, et al. Extended-culture and culture-independent molecular analysis of the airway microbiota in cystic fibrosis following CFTR modulation with ivacaftor. *J Cyst Fibros.* 2021;20(5):747-53. DOI: 10.1016/j.jcf.2020.12.023
165. Sabino R, Carolino E, Moss RB, Banaei N, Verissimo C, Stevens DA. Susceptibility of *Candida albicans* from Cystic Fibrosis Patients. *Mycopathologia.* 2017;182(9-10):863-7. DOI: 10.1007/s11046-017-0133-9
166. Prevaes SM, de Steenhuijsen Pijters WA, de Winter-de Groot KM, Janssens HM, Tramper-Stranders GA, Chu ML, et al. Concordance between upper and lower

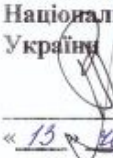
- airway microbiota in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1602235. DOI: 10.1183/13993003.02235-2016
167. Grandjean Lapierre S, Phelippeau M, Hakimi C, Didier Q, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, et al. Cystic fibrosis respiratory tract salt concentration: An Exploratory Cohort Study. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(47):e8423. DOI: 10.1097/MD.00000000000008423
 168. Muggeo A, Perotin JM, Brisebarre A, Dury S, Dormoy V, Launois C, et al. Extended Bacteria Culture-Based Clustering Identifies a Phenotype Associating Increased Cough and Enterobacterales in Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Microbiol*. 2021;12:781797. DOI: 10.3389/fmicb.2021.-781797
 169. Vermeulen F, Proesmans M, Vermaelen M, Boon M, De Boeck K. Isolation of Enterobacteriaceae in airway samples is associated with worse outcome in preschool children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2020;19(3):365-9. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.10.019
 170. Wootton M, Davies L, Pitman K, Howe RA. Evaluation of susceptibility testing methods for *Burkholderia cepacia* complex: a comparison of broth microdilution, agar dilution, gradient strip and EUCAST disc diffusion. *Clin Microbiol Infect*. 2020:S1198-743X(20)30708-4. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.012
 171. Van Dalem A, Herpol M, Echahidi F, Peeters C, Wybo I, De Wachter E, et al. In Vitro Susceptibility of *B. cepacia* complex Isolated from Cystic Fibrosis Patients to Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(9):e00590-18. DOI: 10.1128/AAC.00590-18
 172. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:7. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00007
 173. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *S. aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445-59. DOI: 10.4161/viru.2.5.17724
 174. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623-33. DOI: 10.1038/nrmicro2415

175. Gutiérrez-Fernández J, Gámiz-Gámiz A, Navarro-Marí JM, Santos-Pérez JL. Genitourinary tract infection in children due to *Aerococcus* other than *Aerococcus viridans*. Literature review and 3 case reports. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021;39(3):156-8. DOI: 10.1016/j.eimc.2020.05.017
176. Parrey AH, Sofi F, Ahmad M, Kuchay A. *Aerococcus viridans* infection presenting as cutaneous vasculitis in an immunocompetent patient. *Reumatologia*. 2016;54(6):318-20. DOI: 10.5114/reum.2016.64909
177. Chen LY, Yu WC, Huang SH, Lin ML, Chen TL, Fung CP, et al. Successful treatment of *Aerococcus viridans* endocarditis in a patient allergic to penicillin. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45(2):158-60. DOI: 10.1016/j.jmii.2011.09.010
178. Varshini K, Ganesan V, Charles J. *Aerococcus viridans* Bacteremia: A Rare Case Report from India. *Indian J Crit Care Med*. 2022;26(1):127-8. DOI: 10.5005/jp-journals-10071-24072
179. Zhou W, Nanci V, Jean A, Salehi AH, Altuwaijri F, Cecere R, et al. *Aerococcus viridans* native valve endocarditis. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2013;24(3):155-8. DOI: 10.1155/2013/470413
180. Кременчуцкий ГН, Юргель ЛГ, Шарун ОВ, Степанський ДО, Вальчук СІ, Кошова ІП, та ін. Методи виділення та ідентифікації грампозитивних каталазонегативних коків: метод. рек. Київ; 2009. 19 с.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
Державна організація «Центр тестування професійної компетентності
фахівців з вищою освітою напрямів підготовки «Медицина» і «Фармація» при
Міністерстві охорони здоров'я України»
(ДО «Центр тестування»)

ПОГОДЖЕНО
Віце президент
Національної академії медичних наук
України

Володимир КОВАЛЕНКО
«13» червня 2022 р.

ЗАТВЕРДЖЕНО
Заступник Міністра охорони
здоров'я України

Ірина МИКИЧАК
«13» червня 2022 р.

ПЕРЕЛІК

наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження
досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я

(Випуск 8)

Київ – 2022

Регстр. № 104/8/22

1. МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ СУПРОВІД ДІТЕЙ З МУКОВІСЦИДОЗОМ: МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

2. НДР «Бронхіти у дітей з коморбідними станами: клінічний перебіг та їх сучасна етіологія», номер державної реєстрації: 0116U004962.

3. Мікробіологія, Педіатрія

4. 1+, 2++ та 2+, А, В, С, D. Дані методичні вказівки містять експертну думку щодо правильної тактики і є адаптованими до реалій української медичної системи.

5. Microbiological features of staphylococcus aureus isolated from respiratory tract of children with cystic fibrosis Wiadomości Lekarskie, volume lxxiv, issue 9 part 1, september 2021. P. 2094-2100. Oksana Ishchenko, Inna Borysova, Dmytro Stepanyskyi, Iryna Koshova. Стратегії виживання *Pseudomonas aeruginosa* в дихальних шляхах при муковісцидозі. Вісник проблем біології і медицини. – 2021. – Вип.2 (160). – С.29-34. О.В. Іщенко, А.О. Андріяшина, Д.О. Степанський, І.П. Кошова

6. Відсутня

7. МВ є моногенним захворюванням, на яке страждають щонайменше 100 000 людей у всьому світі. Причиною захворювання є мутації в гені ТРБМ, який функціонує як хлорний канал на апікальній поверхні епітеліальних клітин і забезпечує транспорт хлору та бікарбонатів. Такий дефект призводить до дегідратації та алідифікації слизових оболонок, і, як наслідок, появи в'язкого секрету екзокринних залоз. В дихальних шляхах виникає порушення мукоциліарного кліренсу з подальшим розвитком порочного кола «хронічне запалення – хронічна інфекція», в патогенезі якого неможливо визначити первинний компонент. І хоча середня очікувана тривалість життя при МВ продовжує зростати завдяки доступності антибіотиків та модулаторів ТРБМ, різні інфекційні агенти і сьогодні залишаються безпосередньою загрозою. Типові мікроорганізми, які виділяють від пацієнтів з МВ наділені особливими факторами вірулентності, зокрема стійкістю до антибіотиків та здатністю утворювати особливі фенотипи, які потребують особливої уваги та можуть викликати складнощі в індикації та ідентифікації.

Надання медичної допомоги пацієнтам хворим на МВ вимагає мультидисциплінарного підходу з використанням найкращих доступних практик. Мікробіологічний профіль пацієнта враховується при комплексній оцінці стану дихальної системи, проте є також важливим і для організації інфекційного контролю в закладах охорони здоров'я, що надають допомогу хворим на МВ.

В даному керівництві ми виклали рекомендації з мікробіологічного супроводу пацієнтів з МВ, засновані на сучасних доказових даних та існуючій світовій практиці.

8. Методичні рекомендації укладені з урахуванням існуючого досвіду надання медичної допомоги дітям хворим на муковісцидоз і присвячені мікробіологічним аспектам – забір та транспортування біологічного матеріалу, особливостей бактеріологічного дослідження та тестування отриманих культур на чутливість до антибіотиків. Окремо розглянуті питання попередження інфікування патобіонтами асоційованими з муковісцидозом. Практично-методичні рекомендації призначені на допомогу лікарям загальної практики та пульмонологам, що надають допомогу

пацієнтам з муковісцидозом, а також працівникам бактеріологічних лабораторій, що працюють з таким біологічним матеріалом.

9. Кадрові ресурси – лікар-лаборант зі спеціальності «Бактеріологія», спеціаліст з вищою немедичною освітою зі спеціальності «Лабораторна діагностика» або «Біологія» та досвідом роботи в мікробіологічній лабораторії, лікар-інфекціоніст дитячий з досвідом мікробіологічних досліджень, лікар-педіатр, лікар загальної практики-сімейної медицини, лікар пульмонолог дитячий.

Вироби медичного призначення – одноразові стерильні медичні витратні матеріали для забору біологічного матеріалу для дослідження (контейнери для мокротиння, ватні аплікатори, шпатели). Для безпосереднього дослідження біологічного матеріалу – поживні середовища для культивування мікроорганізмів, системи для ідентифікації мікробних культур, набори для дослідження на чутливість до антибіотиків. Окрім того, приладдя для культивування мікроорганізмів – анаеростат та реактиви для створення різних атмосферних умов (анаеробних, капнофільних), термостат тощо.

Інше приладдя, необхідне для стандартного мікробіологічного дослідження та утримання устаткування.

10. Методичні вказівки мають бути використанні при роботі з мікробіологічним матеріалом від дітей, хворих на муковісцидоз, на преаналітичному, аналітичному та постаналітичному етапах.

11. Протипоказання стосуються не доцільності прицільного пошуку особливих фенотипів патобіонтів, зазвичай асоційованих з муковісцидозом, при дослідженні біологічного матеріалу при мікробіологічних дослідженнях іншого нозологічного спрямування. Проте, це не є протипоказанням, але застереженням з метою оптимізації якості дослідження та витрат.

12. Організація роботи з біологічним матеріалом має виконуватися відповідно до прийнятих керівництв. Лабораторія повинна надавати точні та своєчасні результати мультидисциплінарній команді з муковісцидозу за узгодженою схемою, в тому числі невідкладно повідомляти важливі результати. Працівники лабораторії повинні мати достатню кваліфікацію та знання для роботи з широким спектром патогенів асоційованих з МВ.

В лабораторії повинна існувати система розслідування помилок та інших інцидентів, разом з доказами того, як отриманий досвід використовуються для покращення якості роботи. Бажано, щоб мікробіологічна служба проходила внутрішній та зовнішній аудит. Прикладами аудитів є оцінка часу виконання дослідження (тобто час між отриманням зразка в лабораторії та часом, коли результат буде доступним для мультидисциплінарній команді з муковісцидозу), точність ідентифікації та тестування на чутливість, а також відповідне та швидке повідомлення термінових результатів).

13. Дніпровський державний медичний університет

14. Відсутні.

15. Д.мед.н., проф. Степанський Д.О.; Іщенко О.В.; к.мед.н., доц. Кошова І.П.

Контактна особа: Іщенко О. В. +380 961511847.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

д. мед. н., професор Олег ВЛАСЕНКО

«» 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

- 1. Назва пропозиції:** «Оптимізація мікробіологічного супроводу дітей з муковісцидозом».
- 2. Установа-розробник:** Дніпровський державний медичний університет, вул. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна.
- 3. Розробник:** Іщенко Оксана Володимирівна
- 4. Джерела інформації:**
 1. Ishchenko O., Koshova I., Borysova I., Stepanskyi D. Microbiological features of Staphylococcus aureus isolated from respiratory tract of children with cystic fibrosis. Wiad Lek. 2021; 74 (9cz1): 2094-2099. PMID: 34725282.
 2. Ishchenko O. V., Stepanskyi D. O. Microbiological features of Pseudomonas aeruginosa obtained from children with Cystic Fibrosis. Medicni perspektivi. 2021; 26 (3): 131-138. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2021.3.242-130>
 3. Ishchenko O, Koshevaya I, Zhernosekova I, Garets V, Stepanskyi D. The Levels of the Human- β -Defensin-2 and LL-37 in the Sputum of Children with Cystic Fibrosis: A Case-control Study and Literature Review. Open Access Maced J Med Sci. 2022; 10(B): 2367-73. DOI: <https://oamjms.eu/index.php/mjms/article/view/10835>
 4. Ishchenko O., Koshova I., Krushinska T., Kolesnikova I., Stepanskyi D. Culture-dependent evaluation of the respiratory microbiome in children with cystic fibrosis. EUREKA: Health Sciences. 2022; №4: 39-49. <https://doi.org/10.21303/2504-5679.2022.002568>
- 5. Базова установа, яка проводить впровадження:** Вінницький національний медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України.
- 6. Результати застосування пропозиції** за період з вересня по листопад 2022 р. Матеріали використовуються в наукових дослідженнях кафедри мікробіології.
- 7. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелах інформації (п. 4):** Використання результатів наукових досліджень у науковій роботі дозволяє підвищити інформативність клінічних бактеріологічних досліджень.
- 8. Зауваження, пропозиції:** не вносилися.
- 9. Затверджено** на засіданні кафедри 28. 12. 2022 р. (протокол № 7)

Відповідальний за впровадження

Зав. кафедрою мікробіології

:



доц. Вовк І.М.

проф. Ковальчук В.П.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Дніпровського державного медичного університету

д. мед. н., професор Олександр ГУДАР'ЯН

« 16 » грудня 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

- 1. Назва пропозиції:** «Оптимізація мікробіологічного супроводу дітей з муковісцидозом».
- 2. Установа-розробник:** Дніпровський державний медичний університет, вул. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна.
- 3. Розробник:** Іщенко Оксана Володимирівна
- 4. Джерела інформації:**
 1. Ishchenko O., Koshova I., Borysova I., Stepanyi D. Microbiological features of Staphylococcus aureus isolated from respiratory tract of children with cystic fibrosis. Wiad Lek. 2021; 74 (9cz1): 2094-2099. PMID: 34725282.
 2. Ishchenko O. V., Stepanyi D. O. Microbiological features of Pseudomonas aeruginosa obtained from children with Cystic Fibrosis. Medycni perspektivi. 2021; 26 (3): 131-138.
 3. Ishchenko O., Koshevaya I., Zhernosekova I., Garets V., Stepanyi D. The Levels of the Human- β -Defensin-2 and LL-37 in the Sputum of Children with Cystic Fibrosis: A Case-control Study and Literature Review. Open Access Maced J Med Sci. 2022; 10(B): 2367-73.
 4. Ishchenko O., Koshova I., Krushinska T., Kolesnikova I., Stepanyi D. Culture-dependent evaluation of the respiratory microbiome in children with cystic fibrosis. EUREKA: Health Sciences. 2022; №4: 39-49.
- 5. Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології та медико-біологічної фізики інформатики Дніпровського державного медичного університету (протокол засідання №3 від 15.12.2022 р.).
- 6. Ефективність впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Іщенко О. В. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо сучасних аспектів клінічних бактеріологічних досліджень.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

д. мед. н., професор

Дмитро СТЕПАНСЬКИЙ

Члени комісії:

к. мед. н., доцент

Ірина КОШОВА

к. мед. н., доцент

Алеся ШАРУН