

## АНОТАЦІЯ

*Клименко Х.П.* «Корекція порушень мікробіоти ротової порожнини і місцевого імунітету у дітей з інфекційним мононуклеозом спричиненим вірусом Епштейн-Барр». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 228 – педіатрія (галузь знань 22 – охорона здоров'я). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, 2021.

Зростання показників захворюваності інфекційним мононуклеозом дитячого населення України, спричиненим вірусом Епштейн-Барр, протягом останніх років в значній мірі зумовлено не лише збільшенням випадків захворювання але і кращою діагностикою цієї інфекції. Рівень контагіозності, варіабельність шляхів зараження збудником, виражена тропність вірусу до різних тканин забезпечують тривалу та безсимптомну персистенцію в організмі, яка супроводжується рекурентними випадками хвороби, а відсутність обов'язкових програм з профілактики розповсюдження, здатність Епштейн-Барр вірусу до малігнізації, хронізації процесу на тлі імуносупресії визначають подальшу доцільність дослідження даного захворювання.

Основний симптомокомплекс ІМ у дітей включає тонзиліт, лімфаденопатію, ураження паренхіматозних органів, висип, тривалу гіпертермію. В літературі описують ключову роль дисбіотичних змін мікробіому слизових оболонок ротової порожнини у розвитку деструктивних процесів в мигдаликах, що сприяє росту патогенних збудників на фоні інфікування організму герпесвірусами. Сталість складу орального мікробіому має вирішальне значення для збереження системного здоров'я та протекції розвитку хвороб за рахунок підтримки гомеостазу показників місцевого імунітету. Інфікування організму ЕБВ супроводжується імуносупресією, ослабленням бар'єрної функції слизових оболонок, що сприяє реалізації патогенного потенціалу бактеріальної мікрофлори.

Основну групу було сформовано з 280 хворих з інфекційним мононуклеозом (B27 згідно з МКХ–10), до групи порівняння увійшло 26 дітей, госпіталізованих з діагнозом «Гострий бактерійний тонзиліт» (CA03 згідно МКХ–10); основну групу було розділено на 2 підгрупи: до підгрупи 1 було включено 234 хворих з ІМ зумовленим ЕБВ інфекцією, до підгрупи 2 – 46 пацієнтів з ІМ спричиненим коінфекцією вірусів ЕБВ та ЦМВ. Хворі були госпіталізовані протягом 2016–2021 та отримували лікування у Львівській обласній інфекційній клінічній лікарні.

Пік захворюваності ІМ припадає на вік 1-5 років в усіх досліджуваних групах. Дітей підгрупи 2 було госпіталізовано на  $5,4 \pm 0,8$  день від початку хвороби. Практично у всіх дітей з ІМ (95%) загальний стан був охарактеризований, як середньо важкий. Перебіг захворювання супроводжувався гіпертермічним синдромом, який був тривалішим у пацієнтів підгрупи 1 ( $6,08 \pm 0,54$  днів), лімфаденопатією, гепато та спленомегалією. Гнусявість голосу, наявність налетів на язичку, набряк та гіпертрофія мигдаликів частіше спостерігалися серед пацієнтів підгрупи 2.

Лейкоцитоз у периферичній крові при госпіталізації спостерігався у 69,2% пацієнтів підгрупи 1 і перевищував показник у хворих підгрупи 2. Відповідно лімфоцитоз частіше виявляли у дітей підгрупи 2 у 60,9% при госпіталізації та 41,3% в динаміці захворювання. Частота виявлення атипосих мононуклеарів при поступленні була практично однаковою у обох підгрупах і становила 94,0%, проте в динаміці кількість АМ знизилася у 73,5% дітей підгрупи 1, в той час як у підгрупі 2 показник залишився незмінним. В динаміці лікування АМ частіше виявлялися у пацієнтів підгрупи 1.

Цитолітичний синдром з підвищенням рівня АЛТ частіше виявляли у 33,7% дітей підгрупи 1, в той час як мезенхімально - запальний синдром у вигляді підвищення рівня тимолової проби було виявлено у 71,7% дітей підгрупи 2. Холестатичний синдром (підвищення рівня білірубину спостерігався у 13% дітей обох підгруп.

Мікробіота ротоглотки при ІМ, спричиненому ВЕБ характеризується широким спектром грам позитивних патогенів – піогенного стрептококу,

пневмококу, золотистого стафілококу, цьому сприяє глибоке проникнення вірусної інфекції в епітеліальну тканину і пошкодження її.

Характерним при ЕБВ вірусному тонзиліті є формування бактерійно-грибкових асоціацій, про що свідчить висівання в дітей групи порівняння дріжджеподібних грибів. *S.pyogenes*, ізольований від дітей з ко-інфекцією, виявляв більш високий рівень резистентності до  $\beta$ -лактамних антибіотиків (пеніцилінового ряду і цефалоспоринів III покоління) в порівняннями з ізолятами від дітей двох інших груп. Більш високий рівень резистентних до антибіотиків штамів виявлено серед ізолятів *Enterococcus spp.* Тривожним є зростання частки висівання ванкоміцин резистентних ентерококів від дітей з ІМ, спричиненим як ЕБВ, так і ко-інфекцією. Біохімічними маркерами порушення мікробіоценозу є підвищення концентрації масляної кислоти у пацієнтів із наявною коінфекцією вірусів ЕБВ та ЦМВ що свідчить про дисбіоз, зумовлений збільшенням аеробної флори, а підвищення концентрації оцтової кислоти, є ознакою патологічного процесу викликаного анаеробними патогенами.

Показниками деструктивних змін у тканинах мигдаликів є наростання активності ЛДГ слини, найвища активність спостерігається у дітей із наявною мікст інфекцією, а наявність супутньої патогенної мікрофлори на мигдаликах пацієнтів зумовлює підвищення активності ЛДГ у слині пацієнтів з ІМ. У всіх дітей з ІМ виражено знижений рівень секреторного імуноглобуліну А в слинній рідині, що характеризує недостатність ланки місцевого захисту. У дітей з мікст інфекцією рівень SIgA нижчий порівняно із показниками у дітей підгрупи 1.

Згідно з отриманими даними, ризик колонізації патогенною мікрофлорою слизових оболонок піднебінних мигдаликів був вищим у дітей старших 10-річного віку (OR=1,26), у хворих з виразним гіпертермічним синдромом (OR=1,33), з гепатомегалією (OR=1,22) та у пацієнтів, у яких виявлено прискорену ШОЕ (OR=2,07).

Результати проведених електронно-мікроскопічних досліджень виявили відмінності у локалізації кокової флори (яку за морфологічними ознаками можна типувати як стрептококи) у епітеліальних тканинах при тонзилітах різної етіології – позаклітинна локалізація бактерій при гострому бактерійному

тонзиліті та внутрішньоепітеліальна при тонзилітах на тлі ІМ, що свідчить про синергетичну роль ЕБВ та стрептококів при ураженнях верхніх дихальних шляхів у дітей з ІМ. Високий ступінь адгезії бактерій до епітеліальних поверхонь служить підґрунтям для масивної бактерійної колонізації, що спостерігається при ЕБВ тонзилітах з формуванням мембранозних нашарувань.

Результати проведеного дослідження засвідчують кращу позитивну динаміку перебігу захворювання (за основними симптомами захворювання, динамікою показників ЗАК, бактеріологічних досліджень) у дітей, які окрім стандартної терапії отримували комплексний препарат, який вміщає лізоцим, що підтверджено статистично вірогідними відмінностями цих показників на 10 добу стаціонарного лікування. З огляду на позитивну динаміку основних симптомів захворювання комплексний препарат, який вміщає лізоцим в дітей, хворих на інфекційний мононуклеоз, є патогенетично обґрунтованим.

**Ключові слова:** діти, лікування, інфекційний мононуклеоз, інфекція.

#### ANNOTATION

Klymenko Kh.P. "Oral microbiota and local immunity disorders correction in children with infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus" - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for obtaining a degree of Doctor of Philosophy in specialty 228 - Pediatrics (field of study 22 - Health care). - Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, 2021.

Reasons for the increased incidence of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus among children in Ukraine in recent years include not only increase in cases but also better diagnosis of this infection. The level of infectiousness, variability of transmission routes, significant tropism of the virus to different tissues provide its long-term and asymptomatic persistence in the body, accompanied by cases of recurrent disease, while lack of mandatory programs for Epstein-Barr virus spread prevention, possibility of malignant transformation and chronicity in presence of immunosuppression determine the further relevance of this disease studies.

The main syndromes in case of infectious

mononucleosis (IM) in children include tonsillitis, lymphadenopathy, lesions of parenchymal organs, rash, prolonged hyperthermia. The key role of oral mucosa microbiome dysbiotic changes in destructive processes development in the tonsils, which promotes pathogens' growth in presence of herpesvirus infection has been described. The sustainability of the oral microbiome is crucial for maintaining systemic health and protection against diseases through local immunity homeostasis. EBV infection is accompanied by immunosuppression, weakening of the barrier function of the mucous membranes, which contributes to the realization of the bacterial flora pathogenic potential.

The main group of the study included 280 patients with infectious mononucleosis (B27 ICD-10 code), the comparator group included 26 children hospitalized with a diagnosis of acute bacterial tonsillitis (CA03 ICD-10 code); the main group was divided into 2 subgroups: subgroup 1 included 234 patients with IM caused by EBV infection, subgroup 2 - 46 patients with IM caused by EBV and CMV co-infection. Patients were hospitalized during the 2016–2021 period and received treatment at Lviv Regional Infectious Diseases Clinical Hospital.

The peak incidence of IM occurred at the age of 1 to 5 years in all study groups. Children of subgroup 2 were hospitalized for  $5.4 \pm 0.8$  days from the onset of the disease. In almost all children with IM (95%), the general medical condition was described as moderate. The course of the disease was accompanied by hyperthermic syndrome, which tended to be longer in patients of subgroup 1 ( $6.08 \pm 0.54$  days), lymphadenopathy, hepato- and splenomegaly. Rhinophonia, tongue plaque, edema, and tonsillar hypertrophy were more common among patients in subgroup 2.

Leukocytosis in peripheral blood at hospitalization was observed in 69.2% of patients of subgroup 1 and exceeded that of patients of subgroup 2. Therefore, lymphocytosis was more common in children of subgroup 2 - in 60.9% cases at hospitalization and 41.3% cases during the course of the disease. The atypical mononuclear (AM) cells detection rate at admission was almost the same in both subgroups (94.0%), but during disease progression, the number of AMs decreased in 73.5% of children in subgroup 1, while in subgroup 2 the indicator remained unchanged. During the treatment course, AMs were more often found in patients of

subgroup 1.

Cytolytic

syndrome with elevated ALT levels was more common in 33.7% of children in subgroup 1, while mesenchymal inflammatory syndrome manifesting with elevated thymol levels was found in 71.7% of children in subgroup 2. Cholestatic syndrome with increased bilirubin levels was observed in 13% of children in both subgroups.

The oropharyngeal microbiome in case of IM caused by EBV is characterized by a wide range of gram-positive pathogens - pyogenic streptococci, pneumococcus, *Staphylococcus aureus*. This is facilitated by the deep penetration of viral infection into the epithelial tissue and its subsequent damage.

The formation of bacterial-fungal associations is specifically attributed to EBV tonsillitis, as evidenced by presence of yeast-like fungi in cultures obtained from children in the comparison group. *S.pyogenes*, isolated in cultures from children with co-infection, showed a higher level of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics (penicillins and third-generation cephalosporins) compared with isolates from children of the other two groups. Higher levels of antibiotic-resistant strains were found among isolates of *Enterococcus* spp. The increase in the part of vancomycin-resistant enterococci obtained in children with IM caused by both EBV and co-infection gives cause for concern. Biochemical markers of microbiome disorders include increase in the concentration of butyric acid in patients with EBV and CMV co-infection, which indicates dysbiosis due to increased aerobic flora, and increase in acetic acid, which is a sign of a pathological process caused by anaerobic pathogens.

Indicators of destructive changes in the tonsils' tissues are increased activity of salivary LDH, the highest activity of which is observed in children with mixed infection. The presence of concomitant pathogenic flora on the tonsils causes increased LDH activity in the saliva of patients with IM as well. All children with IM have a reduced level of secretory immunoglobulin A in saliva, which characterizes the lack of local immunity. In children with mixed infection, the level of SIgA is lower compared to children in subgroup 1.

According to the obtained data, the risk of colonization by pathogenic flora of the tonsils mucous membranes was higher in children older than 10 years (OR = 1.26), in patients with severe hyperthermia (OR = 1.33), with hepatomegaly (OR = 1.22), and

in patients with increased ESR (OR = 2.07). The electron microscopic studies results revealed differences in the localization of coccal flora (that morphologically can be classified as streptococci) in epithelial tissues in case of tonsillitis of various etiologies. Extracellular localization of bacteria was more typical in case of acute bacterial tonsillitis and intraepithelial in case of tonsillitis that accompanied IM, indicating a synergistic role of EBV and streptococci in upper respiratory tract lesions in children with IM. The high degree of bacteria adhesion to epithelial surfaces serves as a basis for massive bacterial colonization, which is observed in EBV tonsillitis with the formation of membranous deposits.

The results of the conducted study show better positive dynamics of the disease course (according to the main symptoms of the disease, changes in CBC, bacteriological studies) in children who in addition to standard therapy received a complex drug containing lysozyme, which were confirmed by statistically significant differences in these indicators on the 10th day of inpatient treatment. Given the positive dynamics of the main symptoms' reduction, administration of a complex drug containing lysozyme in children with infectious mononucleosis is pathogenetically justified.

Key words: children, treatment, infectious mononucleosis, infection.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. The investigation of bacterial adhesion of palatine tonsils epithelial cells in patient with infectious mononucleosis / A. Nadraga, A. Lytsyk, **Kh. Klymenko**, O. Khomyn. *Eureka: Health Science*. 2021. № 3. P. 45–52. [doi: http://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.001835](http://doi.org/10.21303/2504-5679.2021.001835) (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті)
2. Клименко Х. П. Клінічна характеристика інфекційного мононуклеозу у дітей з урахуванням особливостей колонізації мікрофлорою ротової порожнини. *The Scientific Heritage*. 2021. Vol. 2, № 60. С. 29-33. [doi: 10.24412/9215-0365-2021-60-2-29-33](http://doi.org/10.24412/9215-0365-2021-60-2-29-33)
3. Клименко Х. П., Надрага О. Б. Синдром тонзиліту у дітей з гострою Епштейн-Барр вірусною інфекцією. *Сучасна педіатрія. Україна*. 2019. № 8. С. 52-56. [doi 10.15574/SP.2019.104.52](http://doi.org/10.15574/SP.2019.104.52) (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті)
4. Klymenko K. Clinical and Laboratory Features of the Clinical Course of Infectious Mononucleosis in Children with Colonization of Tonsillar Mucosa with Pathogens. / Kh. Klymenko. // Fourth annual BTRP Ukraine regional One Health research symposium Kyiv. – 2019. – С. Абстракт №.164
5. Nadraga A. Streptococcus pneumonia coinfection in children with suspected infectious mononucleosis / A. Nadraga, **K. Klymenko**, O. Hladchenko. // ISPPD-11-th international symposium on pneumococci & pneumococcal diseases. – 2018. – С. 416–417. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті)
6. Klymenko K. Clinical and laboratory features of the course of infectious mononucleosis caused by mono and mixed infectin EBV and ЦМВ. / Kh.



Klymenko. // Third annual BTRP Ukraine regional One Health research symposium Kyiv. – 2018. – С. Abstract №395.

7. Надрага О. Б., **Клименко Х. П.** Епштейн-Барр і цитомегаловірусна інфекція у дітей. *Современная педиатрия*. 2017. № 7. С. 7-11. [doi: 10.15574/SP.2017.87.7](https://doi.org/10.15574/SP.2017.87.7). (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті)
8. Клименко Х. П. Інфекційний мононуклеоз у дітей перших п'яти років життя / Х.П.Клименко, О.Б. Надрага // Збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» м. Київ. – 2017. – С.32–35.
9. Клименко Х. П. Клінічні особливості перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей, викликаного вірусом Епштейна-Барр та цитомегаловірусною інфекцією // «Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології» Липень/Вересень – 2017. Т.11. №3 – С. 26-27
- 10.Клименко Х. П. Клініко-лабораторні особливості інфекційного мононуклеозу у дітей зумовленого ЦМВ та ЕБВ інфекцією . // Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених присвячена 25-річчю НАМНУ 23 березня – 2018.