

Влияние местного применения этиотропных препаратов на микробиоту ротоглотки у детей с острой респираторной инфекцией

И.Н. Захарова^{1✉}, zakharova-rmapo@yandex.ru, И.В. Бережная¹, И.С. Кузнецова¹, Т.А. Чередникова², А.В. Махаева^{1,2}, В.Е. Одинцова³, С.И. Кошечкин³, В.А. Романов³

¹ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; 123242, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

² Детская городская поликлиника №140; 127006, Россия, Москва, Оружейный пер., д. 43

³ ООО «Нобиас Технолджис» (Nobias); 123423, Россия, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1, помещ. 1/1

Резюме

Введение. Микробиота полости рта и ротоглотки, активно взаимодействуя с эпителием слизистой оболочки и с иммунной системой, создает антагонистические условия для роста и размножения патогенов. Микробиоценоз-сохраняющая терапия может обеспечить условия для поддержания колонизационной резистентности и снизить вероятность адгезии респираторных вирусов.

Цель. Оценить влияние местного применения различных противомикробных препаратов на микробиоту слизистой оболочки ротоглотки у детей с острой респираторной инфекцией.

Материалы и методы. 120 детей (5–10 лет) с острой респираторной инфекцией были разделены на три группы, в которых в составе комплексной терапии применяли: в 1-й группе – гексетидин-содержащий аэрозоль, во 2-й – детский спрей, содержащий грамицидин С и цетилпиридиния хлорид, в 3-й – 0,01% раствор бензилдиметил-миристоиламино-пропиламмония. В 1-й и 12-й дни наблюдения участникам проводился забор мазка из зева для изучения состояния микробиоты ротоглотки методом 16S рПНК секвенирования. Полученные результаты сравнивали с таковыми у здоровых ровесников.

Результаты и обсуждение. По данным секвенирования микробиота участников всех групп до лечения отличалась от микробиоты здоровых ровесников по показателям альфа- и бета-разнообразия, а также по результатам, полученным методом ближайших балансов. Местное применение антисептических препаратов оказывало влияние на микробиоту на уровне видов и родов микроорганизмов. После лечения во 2-й группе, в отличие от 1-й и 3-й, выявлены статистически значимые изменения балансов на уровне видов в сторону показателей здоровых ровесников.

Выводы. Комбинированный препарат, содержащий цетилпиридиния хлорид и бактериоциноподобный антимикробный пептид грамицидин С, продемонстрировал отсутствие негативного воздействия на комменсальную микробиоту и способствовал стабилизации регионарной микробиоты.

Ключевые слова: боль в горле, острый тонзиллофарингит, острая респираторная инфекция, топическая этиотропная терапия, антимикробные пептиды, бактериоциноподобные пептиды, грамицидин С, микробиота ротоглотки, 16S секвенирование, микробное разнообразие

Благодарности. Авторы декларируют, что секвенирование в рамках данного исследования было осуществлено при поддержке АО «Валента Фарм», без участия каких-либо сотрудников или уполномоченных данной организации в статистическом анализе полученных данных; проведение основной части исследования, статистический анализ и подготовка публикации осуществлены при отсутствии внешнего финансирования.

Для цитирования: Захарова ИН, Бережная ИВ, Кузнецова ИС, Чередникова ТА, Махаева АВ, Одинцова ВЕ, Кошечкин СИ, Романов ВА. Влияние местного применения этиотропных препаратов на микробиоту ротоглотки у детей с острой респираторной инфекцией. *Медицинский совет.* 2024;18(1):25–38. <https://doi.org/10.21518/ms2024-037>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The effect of local use of etiotropic drugs on the oropharyngeal microbiota in children with acute respiratory infection

Irina N. Zakharova^{1✉}, zakharova-rmapo@yandex.ru, Irina V. Berezhnaya¹, Irina S. Kuznetsova¹, Tatyana A. Cherednikova², Anastasia V. Makhaeva^{1,2}, Vera E. Odintsova³, Stanislav I. Koshechkin³, Vladimir A. Romanov³

¹ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Bldg. 1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia

² Children's City Clinic No. 140 DZ of Moscow; 43, Oruzheyny Lane, Moscow, 127006, Russia

³ Nobiatech LLC; 34-1-1/1, Narodnogo Opolcheniia St., Moscow, 123423, Russia

Abstract

Introduction. The microbiota of the oral cavity and oropharynx, actively interacts with the epithelium of the mucous membrane and the immune system, creates antagonistic conditions for the growth and reproduction of pathogens. Microbiocenosis-preserving therapy can provide conditions for maintaining colonization resistance and reduce the likelihood of adhesion of respiratory viruses.

Aim. To evaluate the effect of local use of various antimicrobial drugs on the microbiota of the oropharyngeal mucosa in children with acute respiratory infection.

Materials and methods. 120 children (5–10 years old) with acute respiratory infection were divided into three groups, in which they were used as part of complex therapy: in group 1st – hexetidine-containing aerosol, in group 2nd – a children's spray containing gramicidin S and cetylpyridinium chloride, in the 3rd – 0.01% solution of benzyldimethyl-myristoylammonium. On the 1st and 12th days of observation, participants had a throat swab taken to study the state of the oropharyngeal microbiota using 16S rRNA sequencing. The results obtained were compared with those of healthy peers.

Results. According to sequencing data, the microbiota of participants in all groups before treatment differed from the microbiota of healthy peers in terms of alpha and beta diversity, as well as in the results obtained by the nearest balance method. Local use of antiseptic drugs influenced the microbiota at the level of species and genera of microorganisms. After treatment in the 2nd group, in contrast to the 1st and 3rd, statistically significant changes in the balances at the level of microorganism species were revealed towards the indicators of healthy peers.

Conclusions. A combined drug containing cetylpyridinium chloride and the bacteriocin-like antimicrobial peptide gramicidin S demonstrated no negative effect on commensal microbiota and contributed to the stabilization of the regional microbiota.

Keywords: sore throat, acute tonsillopharyngitis, acute respiratory infection, topical etiotropic therapy, antimicrobial peptides, bacteriocin-like peptides, gramicidin C, oropharyngeal microbiota, 16S sequencing, microbial diversity

Acknowledgment. The authors declare that sequencing within the framework of this study was carried out with the support of JSC “Valenta Pharm”, without the participation of any employees or authorized representatives of this organization in the statistical analysis of the data obtained; the main part of the study, statistical analysis and preparation of the publication was carried out in the absence of external funding.

For citation: Zakharova IN, Berezhnaya IV, Kuznetsova IS, Cherednikova TA, Makhaeva AV, Odintsova VE, Koshachkin SI, Romanov VA. The effect of local use of etiotropic drugs on the oropharyngeal microbiota in children with acute respiratory infection. *Meditsinskiy Sovet.* 2024;18(1):25–38. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/ms2024-037>.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиота – совокупность всех живых микроорганизмов, включая бактерии, археи, грибы и простейшие, присутствующих в определенной анатомической области [1]. Данное микробное сообщество в процессе эволюции устанавливало двухсторонние экологические связи с макроорганизмом, в ходе которых отмечались биохимическое, иммунологическое, метаболическое и прочие виды взаимодействия [2]. И организм человека, и микробиота благодаря симбиозу получают новые возможности в сохранении гомеостаза и наращивании общей резистентности, которые дают существенные преимущества для выживания [3]. Учитывая существенное взаимное влияние и разветвленную сеть взаимодействий с отдельными органами, системами и организмом в целом, микробиоту человека можно рассматривать как отдельный орган [4].

Исследования последних лет уверенно демонстрируют наличие взаимосвязи между составом и состоянием микробиоты верхних дыхательных путей, с одной стороны, и риском развития острого респираторного заболевания (ОРЗ), характером течения и его исходом – с другой [5]. S. Edouard et al. показали, что состав комменсальной микробиоты носоглотки может в значительной степени влиять на восприимчивость пациентов к респираторной вирусной инфекции [6]. Наблюдения, проведенные группой американских исследователей T. Tsang et al., доказывают, что характеристики микробиоты носоглотки людей, контактных по гриппозной инфекции,

различаются у людей с разным результатом контакта в будущем (развилась ли инфекция или нет) [7]. Наконец, в ходе изучения микробиоты верхних дыхательных путей у детей 4–8 лет в динамике было показано, что на фоне ОРЗ вирусной этиологии в образцах назального смыва увеличиваются плотность и частота колонизации *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis* (типичные патогенные представители комменсальной микрофлоры – патобионты) [8]. *S. pneumoniae* может бессимптомно находиться на слизистой оболочке ротоглотки, но на фоне неблагоприятного влияния респираторных вирусов на микробиоту, нарушений функционирования эпителия и мукозального иммунитета нередко наблюдается перемещение микроорганизма в другие отделы организма с развитием воспаления в полости среднего уха, придаточных пазухах носа или нижних дыхательных путях. Вирусно-бактериальное взаимодействие может влиять на состав резидентной микробиоты и запускать трансформацию колонизирующих потенциальных патогенов в возбудителей инфекционных заболеваний [9].

Резидентная микрофлора задней стенки глотки клинически здоровых детей представлена в основном несколькими родами: *Prevotella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Vaillonella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella spp.* и *Neisseria spp.*, которые выявляются практически у всех обследованных [10].

В большинстве случаев отдельные представители комменсальной микробиоты, включая и ее «нормальных» представителей, формируют сложноустроенные полимикробные биопленки. Из более чем 700 видов

микроорганизмов микробиоты ротоглотки около 60% невозможно обнаружить культуральным методом исследования [11]. Материальную основу биопленок, существующих в основном на границе раздела между твердыми и жидкими фазами, составляет т. н. экстрацеллюлярный матрикс (преимущественно полисахариды, а также протеины, нуклеиновые кислоты и липиды), имеющий трехмерную структуру. Благодаря матриксу биопленки сохраняют форму, осуществляя адгезию к различным поверхностям и тесное физическое взаимодействие различных микроорганизмов внутри самой биопленки. Имеющиеся в матриксе системы сложноустроенных и разветвленных каналов способствуют стабильному существованию микробных сообществ с высокоактивной молекулярной коммуникацией, включая Quorum Sensing (чувство кворума), а также значительно выраженным обменом генетической информации (плазмиды) и метаболическими взаимодействиями [12]. В ряде случаев метаболические пути динамически сопрягают нормобионтных и патобионтных представителей микробиоты в составе полимикробных биопленок [13].

Микробиота ротоглотки является одной из важнейших составляющих колонизационной резистентности, формируя динамический функциональный барьер, который помимо взаимодействия с эпителием и иммунокомпетентными клетками макроорганизма закрывает сайты адгезии для патогенных микроорганизмов. Нормобионтные представители комменсальной микробиоты успешно конкурируют с патобионтами, включая условно-патогенные микроорганизмы, за экологическую нишу и ресурсы проживания. Помимо этого, представители микробиоты через разнообразный рецепторный аппарат, включая toll-like рецепторы, модулируют функционирование мукозального иммунитета в составе комплекса клеточных и секреторных неспецифических и специфических реакций, барьерных функций эпителия, мукоцилиарный транспорт, фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, Т-клеточные реакции, а также секреторные компоненты: иммуноглобулины, антимикробные белки, ферменты и их ингибиторы, цитокины и т. п. [14]. Представители комменсальной микробиоты ротоглотки сами являются продуцентами антимикробных пептидов и бактерицинов, являющихся их фактическим «оружием» в борьбе с патобионтными видами микроорганизмов [15]. Одними из наиболее известных антимикробных пептидов являются бактериоцины низин (продуцент – *Streptococcus lactis*) и субтилин (продуцент – *Bacillus subtilis*), а также бактериоциноподобный антимикробный пептид грамицидин С (продуцент – *Aneurinibacillus migulanus*, прежнее название – *Bacillus brevis*). Оба продуцента относятся к группе хорошо изученных продуцентов бактериоцинов и бактериоциноподобных веществ (род *Bacillus* тип/фила *Firmicutes*) [16–18].

Продемонстрировано значительное влияние комменсальной микробиоты ротоглотки (*S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. cristatus*) на реализацию и степень выраженности защитно-воспалительных реакций за счет контроля над гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкин-1 β , 6 и 8, фактор некроза опухоли α) и ряда других механизмов [19–21].

Таким образом, микробиоценоз-сберегающая этиотропная терапия может способствовать достижению выраженного лечебного эффекта не только за счет элиминации возбудителей инфекции, но и благодаря поддержанию адекватного уровня колонизационной резистентности, нормализации функционирования мукозального иммунитета и купированию местного воспалительного процесса [10, 22].

Нами проведено исследование, целью которого явилась комплексная оценка влияния местного применения антисептических препаратов для лечения острого воспаления глотки в рамках ОРЗ вирусной этиологии на микробиоту слизистой ротоглотки, на элиминацию вирусных возбудителей и на клинические проявления заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Открытое сравнительное исследование проводилось в трех параллельных группах с применением рандомизированного включения в каждую группу пациентов из пула потенциальных участников. Исследование было проведено в соответствии с принципами надлежащей клинической практики (Хельсинкская декларация ВМА/2013; GCP-ICH, E6(R2)/2016, Правила надлежащей клинической практики ЕАЭС 2016 г. и др.) в рамках оказания рутинной медицинской помощи в ГБУЗ «Детская городская поликлиника №140». Локальный этический комитет ФГБОУ ДПО РМАНПО принял положительное решение по результатам проведенной экспертизы (ЭКА/12-41.2021, протокол №11 от 21.09.2021 г. с учетом поправок от 29.05.2022 г.).

Для участия в исследовании отбирались пациенты обоего пола в возрасте 5–10 лет включительно, не позднее 3 сут. от момента возникновения заболевания обратившиеся за амбулаторной медицинской помощью по поводу ОРЗ, включая легкую форму COVID-19, и имеющие, кроме других, жалобы на боль в горле различной степени выраженности. Законные представители всех участников выразили свое информированное согласие на участие в исследовании письменно, а сами участники в возрасте 6 лет и старше – в устной форме. В рамках рутинной практики всем пациентам лечащим врачом в составе комплексной терапии назначалось топическое применение антисептических препаратов (один из трех: аэрозоль с 0,2% гексэтидином или детский спрей, содержащий 0,1 мг цетилпиридиния хлорида в комбинации с 0,03 мг грамицидина С, или бензилдиметил-миристоиламино-пропиламмоний в 0,01% растворе для местного применения) курсом 7 сут.

В соответствии с протоколом исследования всем участникам, включенным в исследование, дважды – визит 1 (1-й день) и визит 3 (12-й \pm 1 день) – проводился забор биоматериала (мазок со слизистой оболочки задней и боковых стенок глотки) для оценки микробиоты методом секвенирования полноразмерного гена 16S с использованием набора для взятия, стабилизации и транспортировки микробиоты мазков «Nobias Swab Collection kit» (Нобиаз Технолоджис, Россия). Кроме этого, в рамках исследования осуществлялся учет клинических проявлений заболевания и контроль элиминации возбудителей

инфекции – подробная информация отражена в отдельной публикации [5]. Для более полной оценки результатов секвенирования в ходе биоинформационного анализа использовали образцы аналогичного биоматериала, взятого однократно у здоровых добровольцев в возрасте 4–12 лет ($n = 19$), чьи законные представители выразили письменное информированное согласие на использование результатов секвенирования указанных образцов в исследовании.

Выделение ДНК из образцов проводилось с использованием набора для выделения «stool DNA extraction kit» («Нобиас Технолоджис», Россия). Для амплификации полноразмерного гена 16S рРНК были использованы праймеры F27 и R1492 (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG и GGTTACCTGTAYGACTT соответственно) и амплификатор C1000 (Bio-Rad, США). Очистка полученных ПЦР-продуктов проводилась с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc). Качество полученных ампликонов оценивали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Дальнейшую подготовку библиотек ампликонов и секвенирование осуществляли с использованием реактивов фирмы NEB: репарации однопочечных разрывов и концов НК NEBNext FFPE Repair Mix (M6630), NEBNext End repair/dA-tailing Module (E7546) и лигирования адаптеров NEBNext Quick Ligation Module (E6056). Все промежуточные стадии приготовления библиотеки сопровождались необходимой очисткой образца при помощи магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc). Концентрацию полученных библиотек 16S рРНК в растворе измеряли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США) с использованием набора для высокочувствительного анализа dsDNA Quant-iT™ (Thermo Fisher Scientific). Очищенные библиотеки смешивали в соответствии с оцененными концентрациями. Секвенирование осуществляли с использованием наборов от производителя Oxford Nanopore Technologies: Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109), Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002) и набора для PCR-free мультиплексирования NativeBarcoding Expansion 96 (EXP-NBD196). Секвенирование проводилось на приборе MinION с использованием чипа серии R9 (FLO-MIN106). Для «бейз-коллинга» использовалась программа Guppy (версия 5.1.13), в качестве модели использовался режим High-accuracy basecalling, минимальная отсечка по качеству qscore = 7. Для того чтобы оценить возможную контаминацию в ходе пробоподготовки и провести соответствующие поправки, вместе с образцами микробиоты глотки в каждую партию образцов добавлялся образец отрицательного контроля – капля дистиллированной воды.

В анализе были использованы не более 90 000 ридов на образец. Оценка качества ридов проводилась с помощью программы NanoFilt [23]. Из анализа были исключены риды короче 1 400 bp и с качеством менее 7. Картирование ридов на базу NCBI проводилось с помощью программы «EMU» [24]. Таблицы представленности на уровнях вида, рода, семейства и т. д. были получены путем суммирования представленности ОТЕ (операционных таксономических единиц), принадлежащих

соответствующей таксономической группе. Дальнейший анализ проводился на уровне видов и родов микробов. Из статистического анализа последовательно и отдельно на каждом таксономическом уровне исключались редкие микроорганизмы (частота выявления менее 50% образцов, доля присутствия в образце – 5% и менее).

Таксономический состав микробиоты и его изменения в процессе лечения оценивали с помощью ряда индексов биологического разнообразия. Состав отдельных образцов анализировали с помощью показателей альфа-разнообразия: индекс Chao1 – для оценки степени микробиологического разнообразия (оценивает разнообразие с учетом редких микроорганизмов, значение повышается в случае большего числа таксонов) и индекс Шеннона – для характеристики равномерности представленности различных таксонов в образце (значение увеличивается при повышении видового разнообразия) [25–27]. При сравнении различных образцов между собой использовали меру (индекс) «несходства» Брея – Кертиса (оценивает отношение общих и различающихся таксонов в сравниваемых образцах) и расстояние Эйтчисона (служит для оценки соотношения пропорций микроорганизмов в сравниваемых образцах) [28]. При количественной оценке альфа-разнообразия основными параметрами являются богатство и равномерность. Первое отражает количество различных видов, присутствующих в данном сообществе. Второе – сравнивает однородность представленности популяции каждого из видов.

Статистический анализ данных проводился в среде программирования R. Для проверки статистической значимости различий в пропорциях микроорганизмов между двумя группами образцов использовался анализ PERMANOVA (функции adonis2 пакета vegan) для расстояния Эйтчисона. При анализе изменений у пациентов учитывалась парность образцов. Если согласно PERMANOVA наблюдались различия между группами образцов, то для их интерпретации использовался метод ближайших балансов (пакет NearestBalance, функции nb_lm() и nb_mean_shift()) [HYPERLINK «https://paperpile.com/c/czet4j/RWp3»](https://paperpile.com/c/czet4j/RWp3) [29]. Статистический анализ альфа-разнообразия и изменений балансов проводился с помощью критерия Манна – Уитни для сравнения непарных выборок (образцов больных и здоровых) и критерия Вилкоксона для анализа изменений у пациентов. Сравнение внутри и межгруппового бета-разнообразия (меры Брея – Кертиса) проводилось с помощью PERMANOVA, так же как анализ расстояния Эйтчисона. При проверке гипотез использовался порог значимости 0,05. Поправка на множественное сравнение делалась с помощью метода Бенджамини – Хохберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках реализации исследования было сформировано 3 группы по 40 участников в каждой. В группе 1 топическая терапия осуществлялась аэрозолем, содержащим гексэтидин 0,2%, в группе 2 – комбинацией цетилпиридиния хлорида и грамицидина С, в группе 3 – раствором бензилдиметил-миристоиламино-пропиламмония (0,01%).

● **Таблица 1.** Демографические характеристики и показатели выраженности проявлений заболевания в группах участников исследования

● **Table 1.** Demographic characteristics and disease severity scores in the study groups of subjects

Параметр/показатель		Группа 1 (n = 40)	Группа 2 (n = 40)	Группа 3 (n = 40)
Средний возраст, M ± SD [±95% ДИ], лет		7,1 ± 2,24 [6,4–7,8]	7,9 ± 2,12 [7,2–8,6]	7,3 ± 1,81 [6,9–9,1]
Пол	Мальчики, % (абс.) [±95% ДИ], доли	45% (18) [29–62%]	45% (18) [29–62%]	42,5% (17) [27–59%]
	Девочки, % (абс.) [± 95% ДИ], доли	55% (22) [38–70%]	55% (22) [38–70%]	57,5% (23) [41–73%]
Рост, вес	Все показатели в пределах нормы, % (абс.) [±95% ДИ], доли	85% (34) [70–94%]	95% (38) [83–99%]	87,5% (35) [73–96%]
Среднее значение оценки выраженности симптома «боль в горле», M ± SD [±95% ДИ] (Me; IQR), балл		3,2 ± 0,74 [3,0–3,5] (3; 0)	3,5 ± 0,64 [3,3–3,7] (3; 1)	3,2 ± 0,52 [3,0–3,4] (3; 1)
Среднее значение суммарной оценки выраженности фарингоскопических признаков воспаления, M ± SD [±95% ДИ] (Me; IQR), балл		13,6 ± 2,92 [12,7–14,6] (15; 4)	14,3 ± 3,21 [13,2–15,3] (15; 5)	13,1 ± 2,51 [12,3–13,9] (13; 4)

Все препараты применялись в режиме и дозах в соответствии с инструкциями по медицинскому применению.

По основным характеристикам (демографические параметры и выраженность проявлений заболевания) группы участников исследования не имели значимых различий (табл. 1).

В общей сложности было проанализировано 255 образцов микробиоты с учетом 15 образцов от здоровых добровольцев и 120 парных проб от пациентов. После контроля качества образцов микробиоты полости рта в исследовании участвовало 254 пробы. Один образец пациента был исключен из анализа, т. к. содержал менее 2 500 ридов после фильтрации по качеству и картированию. Таким образом, после фильтрации по качеству и картированию анализу подлежали 239 образцов с покрытием > 2 500 от 119 участников и 15 образцов от здоровых добровольцев (рис. 1). Контроль чистоты подтвердил отсутствие загрязнения на этапе пробоподготовки.

ИСХОДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОБИОТЫ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

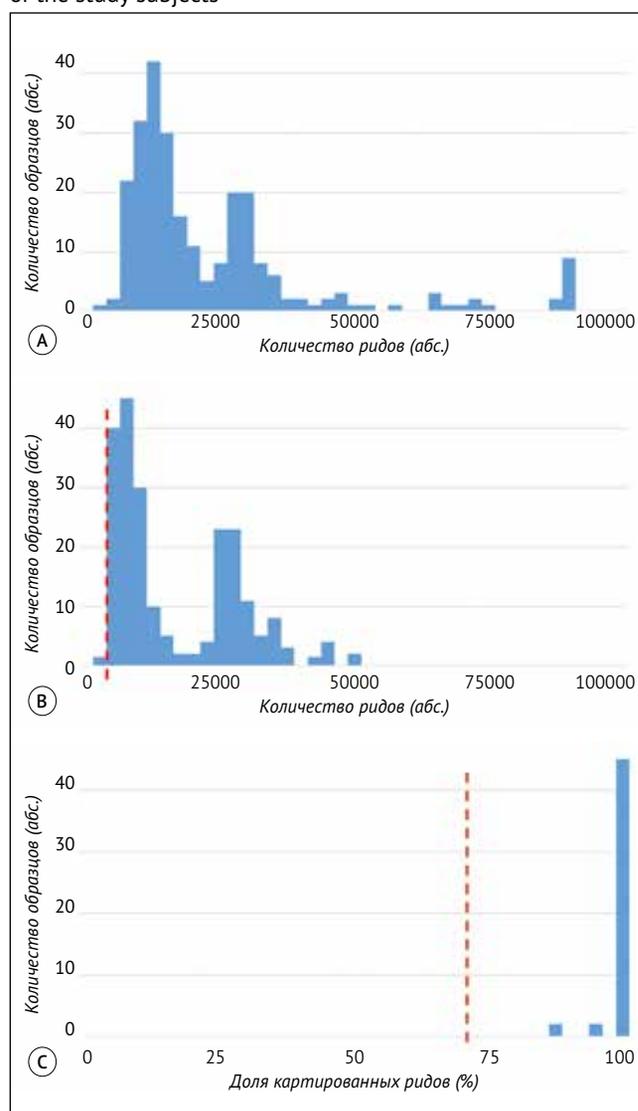
Итоговые пропорции представителей микробиоты ротоглотки в образцах на уровне родов и видов представлены в виде тепловых карт (рис. 2). Во всех группах доминировали роды *Haemophilus*, *Streptococcus*, в значительной степени были представлены также роды *Prevotella*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Gemella*, *Leptotrichia* и *Fusobacterium*. Среди отдельных видов во всех группах в больших пропорциях выявлялись *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, а в группах пациентов – *Streptococcus salivarius*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae* и *Veillonella dispar*.

Микробиота здоровых ровесников статистически значимо отличалась от микробиоты детей с ОРЗ до лечения как по пропорциям бактерий (расстоянию Эйтчисона), так и по альфа- и бета-разнообразию Брея – Кертиса (табл. 2): индекс Шеннона у пациентов был повышен, индекс Chao1 не отличался, а различие между образцами внутри групп здоровых и больных было меньше, чем между образцами из различных групп пациентов (рис. 3).

Для того чтобы оценить, в чем именно заключается различие между микробиотой здоровых и детей

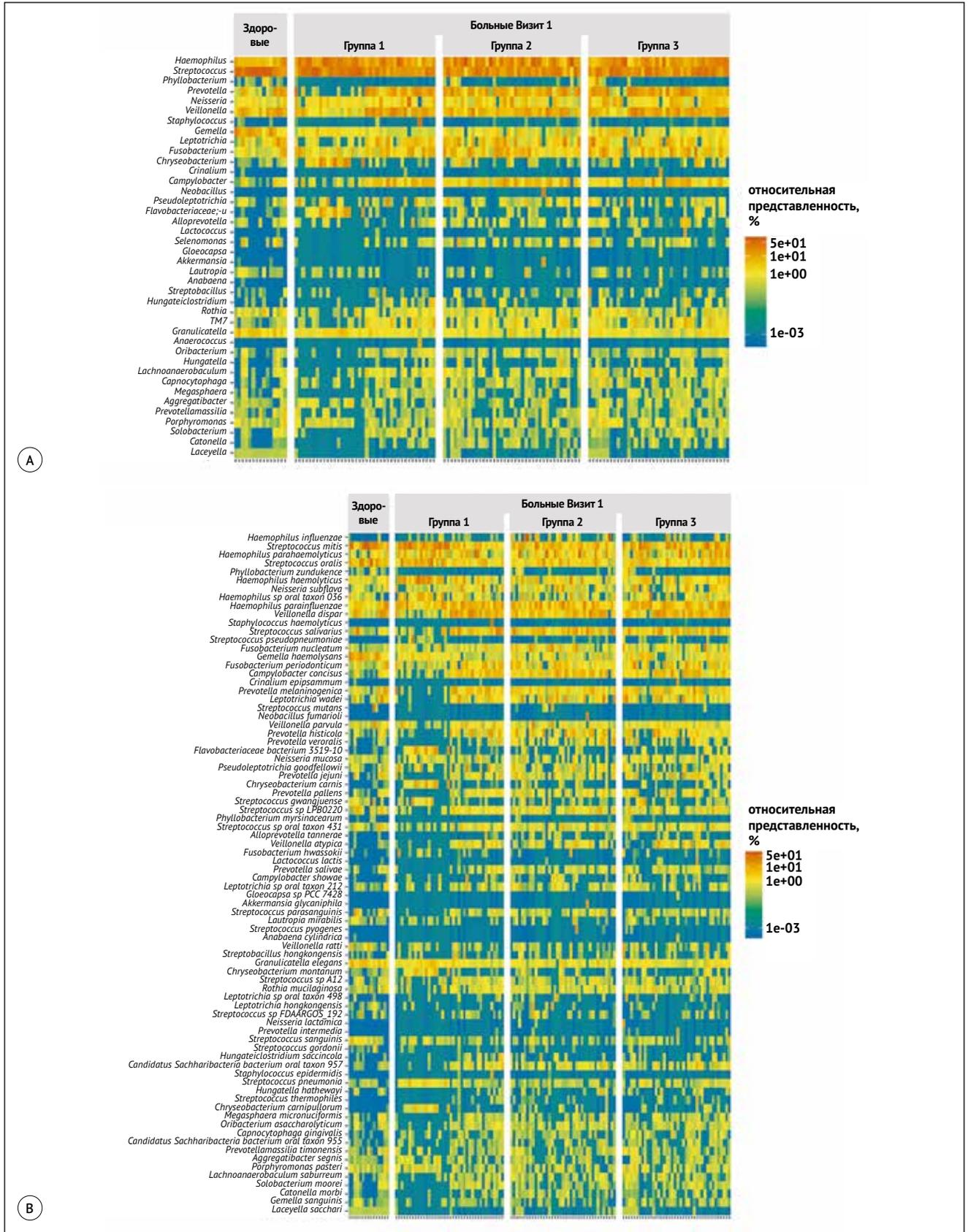
● **Рисунок 1.** Оценка качества образцов микробиоты участников исследования

● **Figure 1.** Evaluating the quality of microbiota samples of the study subjects



Гистограммы распределения образцов по количеству полученных ридов на образец: А – до фильтрации по аппаратным баллам качества и длине ридов; В – после фильтрации – красной пунктирной линией обозначен порог минимально необходимого количества ридов для проведения анализа микробиоты, соответствующий 3000 ридам на образец; С – гистограмма распределения образцов по доле ридов, для которых определена таксономия. Красной пунктирной линией обозначен порог минимально необходимого процента картирования, соответствующий 70%

● **Рисунок 2.** Тепловая карта таксономического состава образцов микробиоты здоровых и участников исследования до лечения (больные, визит 1)
 ● **Figure 2.** Heat map showing taxonomic composition of the microbiota samples of the healthy volunteers and study subjects before initiation of treatment (patients, Visit 1)



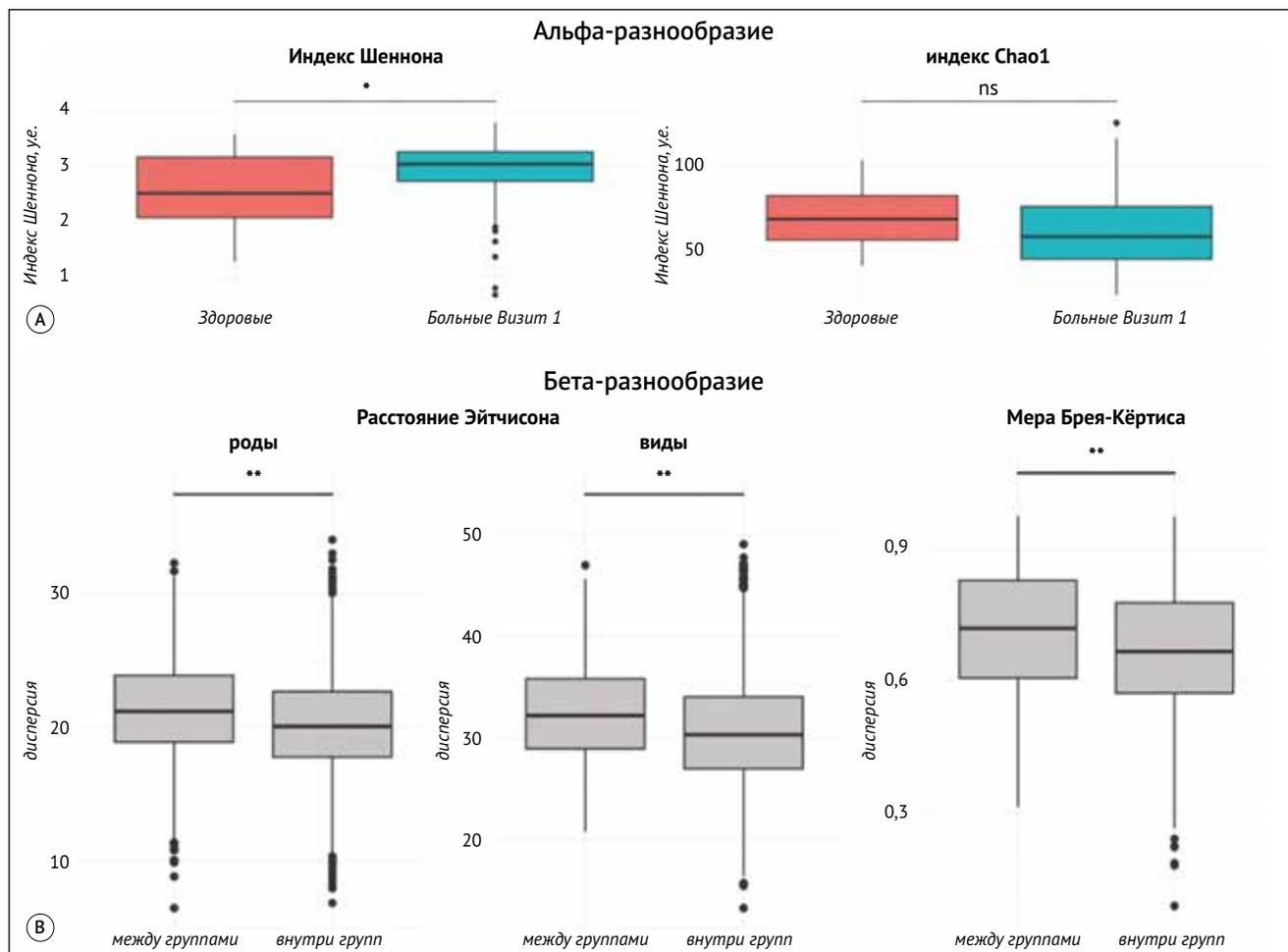
А – на уровне родов; В – на уровне видов. Цвет кодирует относительную представленность таксонов (столбцы) в образцах (строки). Таксоны упорядочены по максимальному значению представленности в образцах

- **Таблица 2.** Различия между микробиотой здоровых добровольцев и пациентов до начала лечения на уровне родов и видов
- **Table 2.** Genus and species differences between microbiota of the healthy volunteers and subjects before initiation of treatment

Показатель	Способ оценки показателя	p-значение	R ²
Бета-разнообразие	расстояние Эйтчисона на уровне рода*	0,001	0,03
	расстояние Эйтчисона на уровне вида*	0,001	0,03
	мера Брея – Кертиса*	0,001	0,04
Альфа-разнообразие	индекс Шеннона**	0,054	-
	индекс Chao1**	0,16	-

Примечание: * – сравнение проводили методом PERMANOVA; ** – сравнение проводили с помощью критерия методом Манна – Уитни.

- **Рисунок 3.** Сравнения альфа- и бета-разнообразия у здоровых добровольцев и пациентов до начала лечения
- **Figure 3.** Comparative analysis of alpha and beta diversity between the healthy volunteers and patients before initiation of treatment



А – альфа-разнообразие (сравнение с помощью критерия Манна – Уитни); В – бета-разнообразие и сравнение с помощью PERMANOVA-сходства образцов из одной и той же группы участников (здоровые или пациенты) и из разных групп пациентов. Сравнение проведено для сходства образцов по пропорциям микробов (расстоянию Эйтчисона на уровне родов и видов) и по мере Брея – Кертиса

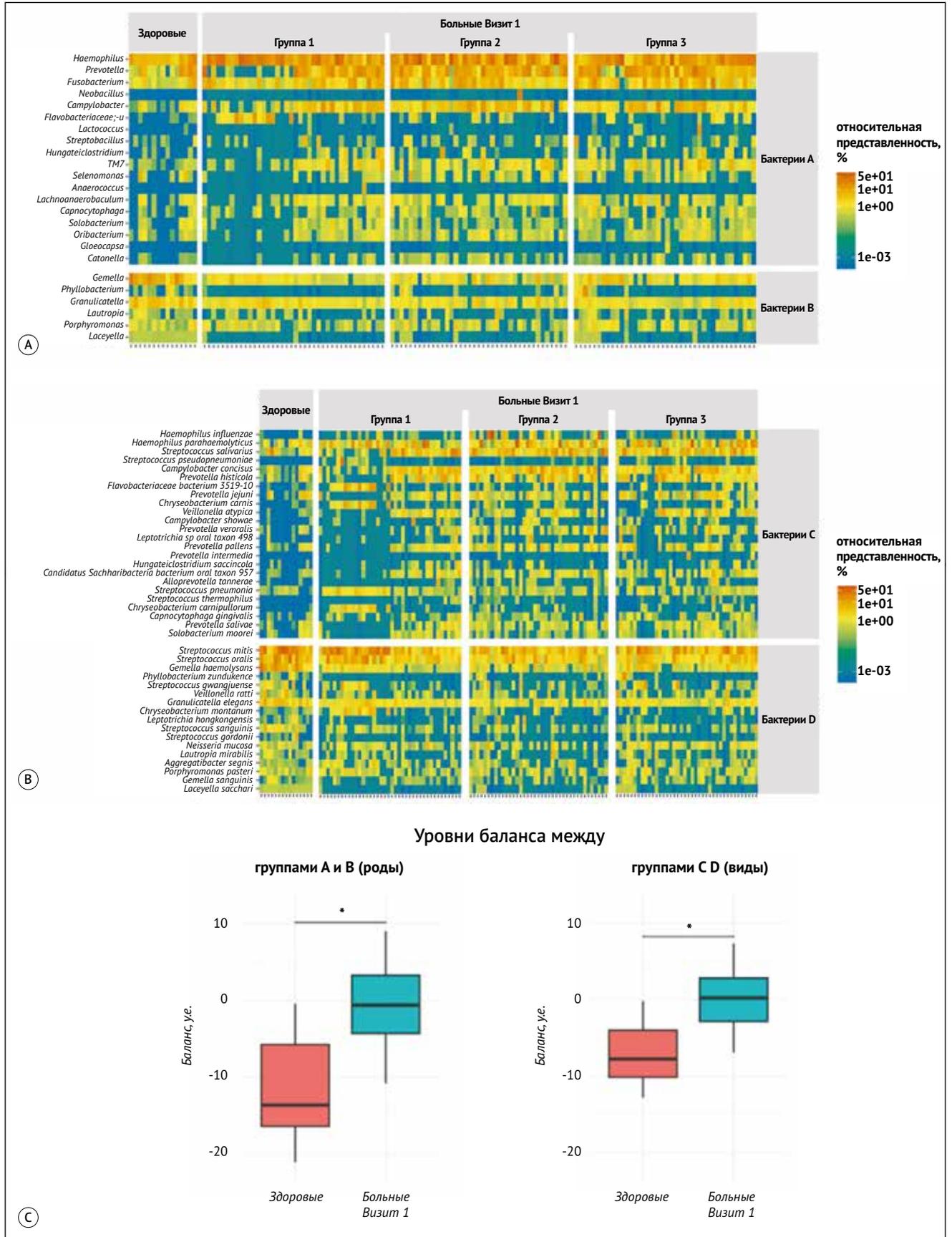
* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, ns – незначимый результат ($p > 0,05$)

с ОРЗ, был использован метод NearestBalance. Он описывает различия между средним микробиомом пациентов и здоровых добровольцев путем сравнения показателей т. н. баланса между двумя группами микроорганизмов. Баланс представляет собой характеристику образца, пропорциональную среднему логарифму отношения между представленностями микроорганизмов каждой из сравниваемых групп, рассчитанному по всем таким парам представителей микробиоты. Группы микроорганизмов подбираются так, чтобы пропорции бактерий внутри каждой из этих групп микроорганизмов были

примерно одинаковыми во всех образцах, а доли микроорганизмов из сравниваемых групп образцов как можно сильнее различались у пациентов и здоровых [29]. Представленность микроорганизмов с учетом группировок на уровне родов и видов, а также результаты данного анализа в виде уровня баланса представлены на рис. 4.

После применения группирования микроорганизмов отмечается преобладание у здоровых рода *Gemella*, а у пациентов до лечения – родов *Haemophilus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* и *Campylobacter*. В отношении видов микроорганизмов различия отмечались в группе здоровых

● **Рисунок 4.** Различия в таксономическом составе образцов, взятых у пациентов на первом визите и у здоровых добровольцев
 ● **Figure 4.** Differences in the taxonomic composition between samples collected from subjects at Visit 1 and from healthy volunteers



А – тепловая карта таксономического состава образцов микробиоты на уровне родов; В – тепловая карта таксономического состава образцов микробиоты на уровне видов; С – уровни баланса бактерий в соответствии с результатами анализа различий * p ≤ 0,0001

в виде преобладания *Gemella haemolisans*, *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis*, а в группах пациентов до лечения – *Haemophilus parahaemolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Campylobacter concisus*. Метод ближайших балансов продемонстрировал статистически значимые различия между микробиотой здоровых и больных до начала лечения.

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

При сравнении микробиоты в образцах, взятых у пациентов после проведенной терапии с исходными результатами, были отмечены изменения показателей бета-разнообразия во всех группах (табл. 3). Изменения коснулись пропорций родов и видов представителей регионарной микробиоты, а также меры Брея – Кертиса. В группе 1 (в отличие от групп 2 и 3) отмечалось изменение альфа-разнообразия (повышение индекса Шеннона).

В большей степени вовлеченные в изменения микробиоты роды и виды микроорганизмов различались в сравниваемых группах (рис. 5). В группе 1 отмечались наиболее резкие изменения к визиту 3 как на уровне родов (значительные нарастания пропорций родов *Prevotella*, *Campylobacter* и *Rotia*), так и на уровне видов – в виде очень выраженного нарастания доли *Neisseria subflava*, нескольких видов *Prevotella* и *Streptococcus*, включая *S. salivarius*. В группе 3 также отмечались заметные изменения на фоне лечения. Вместе с тем, по данным тепловой карты, наиболее мягкие реакции отмечались в составе микробиоты ротоглотки в группе 2 (рис. 5А, С).

Уровни балансов микроорганизмов на уровне видов, сгруппированных в Таха V1 и Таха V3, статистически значимо изменялись во всех группах. Вместе с тем в группе 2 уровень баланса наиболее близко соответствовал показателю из группы здоровых детей (рис. 5В, D).

При анализе изменений в показателях балансов между группами микроорганизмов, различающих больных и здоровых, было выявлено, что после проведенного курса топической этиотропной терапии в группе 2 наблюдались статистически значимые изменения в сторону более здорового состояния (приближение

к показателю здоровых детей) как на уровне родов, так и на уровне видов. В группе 3 показатели баланса на уровне видов и родов не имели статистически значимых изменений, а в группе 1 изменения балансов имели статистическую значимость только на уровне родов (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Общепризнанно, что микробиота играет значительную роль в поддержании гомеостаза организма человека не только за счет прямой защиты от инфицирования, но и с помощью регуляторных взаимодействий с двумя не менее важными компонентами – самой слизистой оболочкой и аппаратом местного (мукозального) иммунитета [10, 11, 14, 30].

В настоящем исследовании мы смогли изучить характеристики микробиоты ротоглотки у пациентов дошкольного и младшего школьного возраста, находящихся в самом начальном периоде ОРЗ (не позднее 72 ч от момента возникновения первых симптомов). Именно для детей данного возрастного периода наиболее характерна достаточно высокая частота возникновения ОРЗ на фоне продолжающегося созревания иммунной системы, активной социализации, частых продолжительных контактов с источниками инфекции в сочетании с высокими адаптационными нагрузками, связанными с учебным процессом. Нам удалось не только провести одномоментное сравнение микробиоты значительного числа больных ОРЗ со здоровыми добровольцами такого же возраста, но и изучить изменения, происходящие в процессе реализации инфекции на фоне этиотропной терапии.

Полученные нами результаты во многом совпадают с наблюдениями других исследователей. На различия микробиоты здоровых и пациентов с острыми респираторными инфекциями, включая грипп, COVID-19, указывают многочисленные публикации [6, 7, 31–34]. Например, Q. Ни в ходе сравнения микробиоты ротоглотки у 27 детей младшего возраста, госпитализированных по поводу бронхоолита, и у 22 здоровых детей выявил выраженные различия структуры микробиоты с уменьшением показателей микробного разнообразия

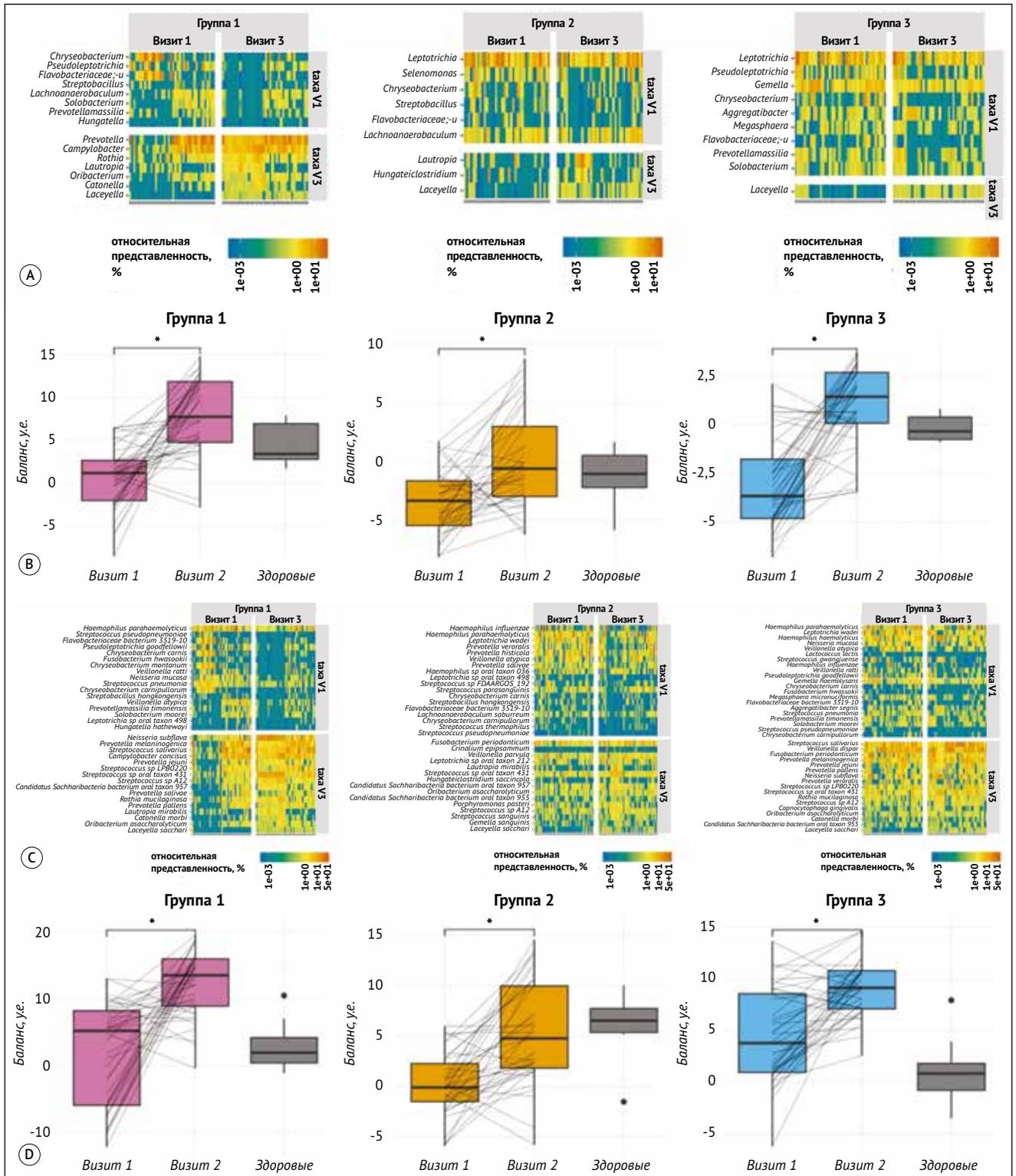
● **Таблица 3.** Статистическая значимость изменений микробиоты пациентов после лечения по сравнению с исходным состоянием

● **Table 3.** Statistical significance of changes in microbiota of the patients after treatment from baseline

Показатель	Метод сравнения	Способ оценки показателя	FDR (false discovery rate)		
			Группа 1	Группа 2	Группа 3
Альфа-разнообразие	Критерий Вилкоксона	Индекс Шеннона	0,017	0,296	0,296
		Индекс Chao1	0,324	0,84	0,070
Бета-разнообразие	PERMANOVA с учетом парности образцов	Расстояние Эйтчисона на уровне рода	0,008	0,01	0,008
		Расстояние Эйтчисона на уровне вида	0,005	0,005	0,005
		Мера Брея – Кертиса	0,007	0,008	0,015
Соотношение бактерий, различающих больных и здоровых	Критерий Вилкоксона	Ln (роды А/роды В)	0,000	0,005	0,055
		Ln (виды С/виды D)	0,001	0,563	0,563

Примечание: FDR (false discovery rate) – статистическая значимость после поправки на множественное сравнение методом Бенджамини – Хохберга для каждого способа оценки показателя.

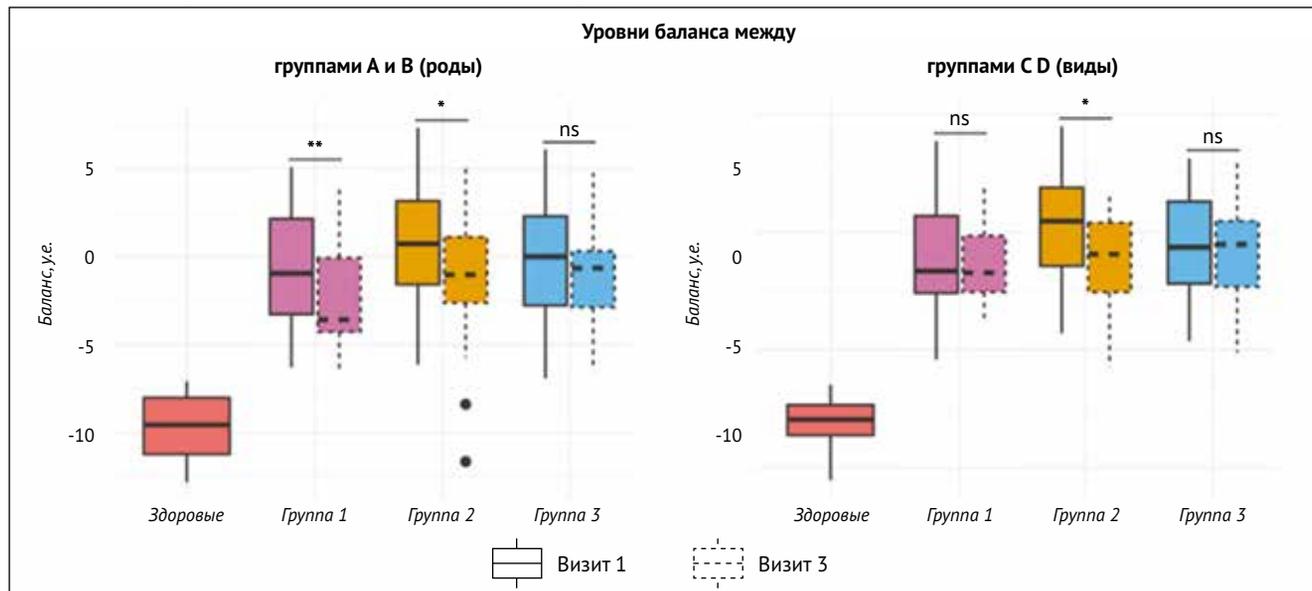
● Рисунок 5. Изменения состава микробиоты в каждой из групп от визита 1 к визиту 3
 ● Figure 5. Changes in microbiota composition in each group over the period from Visit 1 to 3



у госпитализированных. У представителей обеих групп доминантными представителями микробиоты являлись микроорганизмы из рода *Streptococcus*, известного значительным количеством продуцентов бактериоцинов. В то же время у болеющих детей отмечалось выраженное

снижение представленности родов *Neisseria*, *Bacteroides*, *Haemophilus* и ряда других [35]. В нашем исследовании также выявились статистически значимые различия в показателях разнообразия микробиоты больных ОРЗ и здоровых детей. Анализ собранных образцов показал,

- **Рисунок 6.** Изменения в балансах микробов, отличающих больных от здоровых, от визита 1 к визиту 3 между группами родов (А и В) и между группами видов (С и D)
- **Figure 6.** Changes in microbial balances differentiating a sick person from a healthy one over a period from Visit 1 to 3 between (A and B) genera groups and between (C and D) species groups



что острое респираторное заболевание ассоциировано со значительной вариабельностью состава микробиоты: с изменением альфа-разнообразия, пропорций между микробами, отличаем по бета-разнообразию (расстояние Эйтчинсона и мера Брея – Кёртиса). Мы также наблюдали доминирование рода *Streptococcus* во всех группах. При этом мы увидели некоторое увеличение присутствия рода *Gemella* у здоровых, а в группах пациентов, напротив, отмечалось увеличение представленности родов *Haemophilus*, *Neisseria* и *Veillonella (puc. 2)*.

Нами для лечения острых инфекционно-воспалительных заболеваний горла на фоне ОРЗ у детей использовались местные этиотропные препараты. Известно, что на изменения микробиоты на фоне ОРЗ оказывает влияние целый ряд тесно взаимодействующих факторов [14, 30]. В частности, даже краткосрочное применение хлоргексидина вызывает снижение показателей альфа-разнообразия на уровне родов с уменьшением присутствия *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* и ряда других и нарастанием пропорции *Rotia* [36]. В нашем исследовании схожие изменения наблюдались в группе 1 на уровне родов. В ряде исследований подтверждается способность других антисептиков оказывать значимое влияние на состояние микробиоты ротоглотки и верхних дыхательных путей [37].

Благодаря внедрению современных методов выявления и изучения микробиоты (секвенирование) в распоряжение исследователей попадает значительная по объему информация, требующая вместе с тем специальных методов обработки, включая интегральные биоинформационные подходы. Это объясняется не только значительным массивом самих микроорганизмов (более 700 видов), но и тем, что микробиота является сложноустроенной открытой экосистемой, имеющей большое число разветвленных

связей, включая метаболические, а также опосредуемые с помощью бактерицинов и бактериоциноподобных белков, мессенджеров чувства кворума и т. д. [38]. В нашем исследовании использовался один из таких интегративных подходов оценки результатов – метод ближайших балансов [29]. Кроме того, значительный вклад в обоснованность оценки полученных результатов изучения микробиоты пациентов, помимо сравнения с показателями микробиоты здоровых ровесников, привнесло одновременное использование дополнительных методов получения информации: учета динамики клинических проявлений заболевания участников, а также оценки элиминации вирусов – возбудителей ОРЗ [5].

В нашем исследовании в качестве топической этиотропной терапии применялись три препарата, два из которых содержат только один компонент-антисептик (гексэтидин или бензилдиметил-миристоиламино-пропиламония), а в состав еще одного препарата помимо цетилпиридиния хлорида входит противомикробный пептид – грамицидин С. По механизму действия грамицидин С в достаточной степени близок с бактериоцином низинном [39]. Учитывая функциональную близость с бактериоцинами, можно ожидать, что грамицидин С будет способствовать реализации более дружественного взаимодействия с комменсальной микробиотой ротоглотки [40, 41].

При оценке результатов секвенирования по данным тепловых карт, в отличие от групп, в которых терапия проводилась монокомпонентными препаратами-антисептиками (группы 1 и 3), в группе 2 были получены наименее резкие и значительные изменения состава микробиоты на уровне родов и видов от 1-го (визит 1) к 12-му дню наблюдения (визит 3). Напротив, наиболее резкие изменения на уровне родов и видов отмечались в группе 1. Результаты анализа степени изменений

микробиоты в процессе лечения методом ближайших балансов показали, что в группе 2 мера баланса наиболее приблизилась к показателю здоровых ровесников. При целенаправленном анализе содержания микроорганизмов, отличающихся больных от здоровых, в группе 1 к визиту 3 отмечалось статистически значимое изменение меры баланса на уровне родов, в группе 2 такие изменения регистрировались и на уровне родов, и на уровне видов, причем меры балансов приближались к таковым у здоровых детей, а в группе 3 статистически значимых изменений вообще не происходило.

Оценка степени элиминации вирусов – возбудителей ОРЗ не выявила значимых различий между группами (к 5-му дню терапии элиминация возбудителей была достигнута в 81% случаев в группе 1, в 92% – в группе 2 и в 74% в группе 3). Однако оценка динамики клинических проявлений и местных признаков воспаления глотки продемонстрировала статистически значимое преимущество комплексного детского спрея, содержащего антисептик и грамицидин С, над моноантисептиками – данные приводятся в предыдущей публикации [5].

В завершение следует отметить, что в рамках данного исследования нам не удалось осуществить наблюдение за участниками в более продолжительные сроки. В связи с этим считаем перспективным проведение аналогичной исследовательской программы с увеличением периода наблюдения, например, до целого эпидсезона, с оценкой частоты повторных эпизодов ОРЗ, с большей кратностью проведения секвенирования микробиоты, а также дополнительно, с определением уровней про-/противовоспалительных цитокинов и проведением цитоморфометрического анализа эпителия слизистой оболочки ротоглотки.

Выводы

Результаты оценки влияния топических этиотропных препаратов при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний глотки у детей с ОРЗ позволяют прийти к следующему заключению.

У детей дошкольного и младшего школьного возраста, находящихся в раннем периоде кинических проявлений острой респираторной инфекции, состояние микробиоты статистически значимо отличается по составу (на уровне родов и видов), а также по показателям альфа- и бета-разнообразия от микробиоты их здоровых ровесников.

На фоне развития ОРЗ и проведения его терапии микробиота также продолжает претерпевать изменения, которые, в числе прочего, могут зависеть от характера лечебного воздействия (в частности, от топического применения этиотропных препаратов).

Проводя комплексную терапию ОРЗ, сопровождающуюся болью в горле, необходимо по возможности добиваться реализации биоценоз-сберегающего воздействия.

Наличие бактерициноподобного противомикробного пептида в комплексе с антисептиком в детском комбинированном спрее позволяет не только обеспечивать более щадящее влияние на регионарную микробиоту, но и достигать более конструктивного взаимодействия с ее комменсальными «нормальными» представителями в обеспечении терапевтического результата, например, более быстрого купирования проявлений воспаления слизистой оболочки ротоглотки.



Поступила / Received 09.01.2024

Поступила после рецензирования / Revised 23.01.2024

Принята в печать / Accepted 09.02.2024

Список литературы / References

- Berg G, Rybkova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.
- Давыдов БН, Самоукина АМ, Михайлова ЕС, Гаврилова ОА, Алексеева ЮА. Варианты микрофлоры ротовой жидкости у практически здоровых детей и подростков. *Стоматология*. 2017;96(1):56–59. <https://doi.org/10.17116/stomat201796156-59>.
- Davydov BN, Samoukina AM, Mikhaïlova ES, Gavrilova OA, Alekseeva JuA. Variations of oral fluid microbiota in healthy children and adolescents. *Stomatologiya*. 2017;96(1):56–59. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/stomat201796156-59>.
- Hehemann J-H, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*. 2010;464(7290):908–912. <https://doi.org/10.1038/nature08937>.
- Najmanová L, Vídeňská P, Cahová M Healthy microbiome – a mere idea or a sound concept? *Physiol Res*. 2022;71(6):719–738. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934967>.
- Захарова ИН, Кузнецова ИС, Чередникова ТА, Махаева АВ, Кошечкин СИ, Романов ВА, Одинцова ВЕ. Результаты комплексной оценки местной этиотропной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний глотки у детей дошкольного и младшего школьного возраста. *Педиатрия. Consilium Medicum*. 2023;(3):135–146. <https://doi.org/10.26442/26586630.2023.3.202304>.
- Zakharova IN, Kuznetsova IS, Cherednikova TA, Makhaeva AV, Koshechkin SI, Romanov VA, Odintsova VE. Pharynx infectious and inflammatory diseases local etiotropic therapy efficacy comprehensive assessment in preschool and primary school-age children. *Pediatrics. Consilium Medicum*. 2023;(3):135–146. (In Russ.) <https://doi.org/10.26442/26586630.2023.3.202304>.
- Edouard S, Million M, Bachar D, Dubourg G, Michelle C, Ninove L et al. The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(9):1725–1733. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3305-8>.
- Thors V, Christensen H, Morales-Aza B, Oliver E, Sikora P, Vipond I et al. High-density Bacterial Nasal Carriage in Children Is Transient and Associated With Respiratory Viral Infections-Implications for Transmission Dynamics. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(5):533–538. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002256>.
- DeMuri GP, Gern JE, Eickhoff JC, Lynch SV, Wald ER. Dynamics of Bacterial Colonization With *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* During Symptomatic and Asymptomatic Viral Upper Respiratory Tract Infection. *Clin Infect Dis*. 2018;66(7):1045–1053. <https://doi.org/10.1093/cid/cix941>.
- Козырев ЕА, Бабаченко ИВ, Сидоренко СВ. Современные аспекты изучения респираторной микробиоты и ее роль в развитии инфекций нижних дыхательных путей. *Инфекционные болезни*. 2022;20(1):99–106. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-1-99-106>.
- Kozyrev EA, Babachenko IV, Sidorenko SV. Current aspects of studying respiratory microbiota and its role in the development of lower respiratory tract infections. *Infectious Diseases*. 2022;20(1):99–106. (In Russ.) <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-1-99-106>.
- Elgamal Z, Singh P, Geraghty P. The Upper Airway Microbiota, Environmental Exposures, Inflammation, and Disease. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(8):823. <https://doi.org/10.3390/medicina57080823>.
- Santacroce L, Passarelli PC, Azzolino D, Bottalico L, Charitos IA, Cazzolla AP et al. Oral microbiota in human health and disease: A perspective. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2023;248(15):1288–1301. <https://doi.org/10.1177/15353702231187645>.
- Степанова ТЮ, Тимофеева АВ. Микробиом ротовой полости человека. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;(5):308. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25212>.
- Stepanova Tlu, Timofeeva AV. The microbiome of the human oral cavity. *Modern Problems of Science and Education*. 2016;(5):308. (In Russ.) Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25212>.
- Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, Alghamdi SA, Mayumi S, Lamont RJ. *Fusobacterium nucleatum* Metabolically Integrates Commensals and

- Pathogens in Oral Biofilms. *mSystems*. 2022;7(4):e0017022. <https://doi.org/10.1128/msystems.00170-22>.
14. Караулов АВ, Афанасьев СС, Алешкин ВА, Воропаева ЕА, Афанасьев МС, Несвижский ЮВ и др. Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет. *Иммунология*. 2015;36(5):290–295. Режим доступа: https://www.immunologiya-journal.ru/patrnrs/pdf/2015/Immunology_05-15.pdf.
Karaulov AV, Afanasyev SS, Aleshkin VA, Voropaeva EA, Afanasyev MS, Nesvizskiy YuV et al. Microflora, colonization mucosal resistance and mucosal immunity. *Immunologiya*. 2015;36(5):290–295. (In Russ.) Available at: https://www.immunologiya-journal.ru/patrnrs/pdf/2015/Immunology_05-15.pdf.
 15. Gallardo-Becerra L, Cervantes-Echeverria M, Cornejo-Granados F, Vazquez-Morado LE, Ochoa-Leyva A. Perspectives in Searching Antimicrobial Peptides (AMPs) Produced by the Microbiota. *Microb Ecol*. 2023;87(1):8. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02313-8>.
 16. Lee H, Kim HY. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus Bacillus. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21(3):229–235. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21464591>.
 17. Mijlkovic M, Jovanovic S, O'Connor PM, Mirkovic N, Jovic B, Filipic B et al. Brevibacillus laterosporus strains BGSP7, BGSP9 and BGSP11 isolated from silage produce broad spectrum multi-antimicrobials. *PLoS ONE*. 2019;14(5):e0216773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216773>.
 18. Berditsch M, Afonin S, Reuster J, Lux H, Schkolin K, Babii O et al. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci. *Sci Rep*. 2019;9(1):17938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54212-z>.
 19. Shu Y, Upara C, Ding Q, Zhu M, Zeng E, Banas JA, Hong L. Spent culture supernatant of Streptococcus gordonii mitigates inflammation of human periodontal cells and inhibits proliferation of pathogenic oral microbes. *J Periodontol*. 2023;94(4):575–585. <https://doi.org/10.1002/JPER.22-0333>.
 20. Kaci G, Goudercourt D, Dennin V, Pot B, Doré J, Ehrlich SD et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(3):928–934. <https://doi.org/10.1128/AEM.03133-13>.
 21. Zhang G, Rudney JD. Streptococcus cristatus attenuates Fusobacterium nucleatum-induced cytokine expression by influencing pathways converging on nuclear factor- κ B. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(2):150–163. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00600.x>.
 22. Козлов ИГ. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия. *РМЖ*. 2018;26(8-1):19–27. Режим доступа: https://www.rmj.ru/articles/allergologiya/Mikrobiota_mukozalnyy_immunitet_iantibiotiki_tonkosti_vzaimodeystviya.
Kozlov IG. Microbiota, mucosal immunity and antibiotics: the subtleties of interaction. *RMJ*. 2018;26(8-1):19–27. (In Russ.) Available at: https://www.rmj.ru/articles/allergologiya/Mikrobiota_mukozalnyy_immunitet_iantibiotiki_tonkosti_vzaimodeystviya.
 23. De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*. 2018;34(15):2666–2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>.
 24. Curry KD, Wang Q, Nute MG, Tyshaieva A, Reeves E, Soriano S et al. Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nat Methods*. 2022;19(7):845–853. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4>.
 25. Кройдер АС, Комарова МВ. Использование индексов биологического разнообразия для анализа микробиоты человека. *Universum: медицина и фармакология*. 2022;3(86):27–31. Режим доступа: <https://7universum.com/ru/med/archive/item/13192>.
Kroider AS, Komarova MV. The use of biological diversity indices for the analysis of human microbiota. *Universum: Medicine and Pharmacology*. 2022;3(86):27–31. (In Russ.) Available at: <https://7universum.com/ru/med/archive/item/13192>.
 26. Клименко ЕС, Белькова НЛ, Рычкова ЛВ, Даренская МА, Тугаринова ОА, Семенова НВ и др. Индексы альфа-разнообразия как показатели вариативности кишечной микробиоты у подростков разных этносов с ожирением. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;176(11):606–610. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-11-606-610>.
Klimenko ES, Belkova NL, Rychkova LV, Darenkaya MA, Tugarinova OA, Semenova NV et al. Alpha diversity indices as indicators of the variability of gut microbiota in adolescents with different ethnicities and obesity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;176(11):606–610. (In Russ.) <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-11-606-610>.
 27. Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J, Weitz JS. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J*. 2013;7(6):1092–1101. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.10>.
 28. Pérez-Castro S, DAuria G, Llambrich M, Fernández-Barrés S, Lopez-Espinosa MJ, Llop S et al. Influence of perinatal and childhood exposure to tobacco and mercury in children's gut microbiota. *Front Microbiol*. 2024;14:1258988. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1258988>.
 29. Odintsova VE, Klimenko NS, Tyakht AV. Approximation of a Microbiome Composition Shift by a Change in a Single Balance Between Two Groups of Taxa. *mSystems*. 2022;7(3):e0015522. <https://doi.org/10.1128/msystems.00155-22>.
 30. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>.
 31. Wen Z, Xie G, Zhou Q, Qiu C, Li J, Hu Q et al. Distinct Nasopharyngeal and Oropharyngeal Microbiota of Children with Influenza A Virus Compared with Healthy Children. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6362716. <https://doi.org/10.1155/2018/6362716>.
 32. Lee KH, Gordon A, Shedden K, Kuan G, Ng S, Balmaseda A, Foxman B. The respiratory microbiome and susceptibility to influenza virus infection. *PLoS ONE*. 2019;14(1):e0207898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207898>.
 33. Thors V, Christensen H, Morales-Aza B, Oliver E, Sikora P, Vipond I et al. High-density Bacterial Nasal Carriage in Children Is Transient and Associated With Respiratory Viral Infections-Implications for Transmission Dynamics. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(5):533–538. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002256>.
 34. Skevaki CL, Tsialta P, Trochoutsou AI, Logotheti I, Makrinioti H, Taka S et al. Associations Between Viral and Bacterial Potential Pathogens in the Nasopharynx of Children With and Without Respiratory Symptoms. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(12):1296–1301. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000872>.
 35. Hu Q, Dai W, Zhou Q, Fu D, Zheng Y, Wang W et al. Dynamic oropharyngeal and faecal microbiota during treatment in infants hospitalized for bronchiolitis compared with age-matched healthy subjects. *Sci Rep*. 2017;7(1):11266. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11311-z>.
 36. Liu T, Chen YC, Jeng SL, Chang JJ, Wang JY, Lin CH et al. Short-term effects of Chlorhexidine mouthwash and Listerine on oral microbiome in hospitalized patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1056534. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1056534>.
 37. Сабанцева ЕГ, Дмитриева НА, Авраменко ЕА, Иванова ЕВ, Ежова ЕГ, Почивалин ВП. Оценка эффективности применения ополаскивателя, содержащего антисептик октенидина дигидрохлорид. *Стоматология*. 2021;100(2):32–39. <https://doi.org/10.17116/stomat202110002132>.
Sabanceva EG, Dmitrieva NA, Avramenko EA, Ivanova EV, Ezhova EG, Pochivalin VP. Evaluation of effectiveness of a mouthwash containing antiseptic octenidine dihydrochloride. *Stomatologiya*. 2021;100(2):32–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/stomat202110002132>.
 38. Sharma A, Singh P, Sarmah BK, Nandi SP. Quorum sensing: its role in microbial social networking. *Res Microbiol*. 2020;171(5-6):159–164. <https://doi.org/10.17116/stomat20211000213210.1016/j.resmic.2020.06.003>.
 39. Wenzel M, Kohl B, Münch D, Raatschen N, Albada HB, Remscic L et al. Proteomic response of Bacillus subtilis to lantibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5749–5757. <https://doi.org/10.1128/AAC.01380-12>.
 40. Захарова ИН, Геппе НА, Сугян НГ, Денисова АР, Бережная ИВ. Топические этиотропные препараты в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний глотки у детей дошкольного возраста. Результаты многоцентрового рандомизированного клинического исследования. *Российская оториноларингология*. 2021;20(1):99–113. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2021-1-102-117>.
Zakharova IN, Geppe NA, Sugyan NG, Denisova AR, Berezhnaya IV. Topical etiotropic drugs in therapy of infectious inflammatory diseases of pharynx in preschool children. Results of multicenter randomized comparative clinical trial. *Rossiiskaya Otorinolaringologiya*. 2021;20(1):99–113. (In Russ.) <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2021-1-102-117>.
 41. Радциг ЕЮ, Гуров АВ. Боль в горле. Перекрестье проблем и поиски решения. *РМЖ. Мать и дитя*. 2022;5(3):228–236. <https://doi.org/10.32364/2618-8430-2022-5-3-228-236>.
Radtsig EYu, Gurov AV. Sore throat. Crossing problems and finding solutions. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2022;5(3):228–236. (In Russ.) <https://doi.org/10.32364/2618-8430-2022-5-3-228-236>.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ДПО РМАНПО (положительное решение в документе ЭКА/12-41.2021, протокол №11 от 21.09.2021). Одобрение и процедуру проведения протокола получали по принципам Хельсинкской конвенции.

Ethics approval. The study was approved by the local ethics committee of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (document ECA/12-41.2021, protocol No. 11 dated 21.09.2021). The approval and procedure for the protocol were obtained in accordance with the principles of the Helsinki Convention.

Вклад авторов:

Концепция статьи – И.Н. Захарова, И.С. Кузнецова

Концепция и дизайн исследования – И.Н. Захарова, И.С. Кузнецова

Написание текста – И.С. Кузнецова, И.В. Бережная

Сбор и обработка материала – И.С. Кузнецова, В.Е. Одинцова, С.И. Кошечкин, В.А. Романов

Перевод на английский язык – А.В. Махаева

Анализ материала – И.С. Кузнецова, Т.А. Чередникова, А.В. Махаева, В.Е. Одинцова, В.А. Романов

Редактирование – И.С. Кузнецова, И.В. Бережная

Утверждение окончательного варианта статьи – И.Н. Захарова, И.В. Бережная, И.С. Кузнецова, Т.А. Чередникова, А.В. Махаева, С.И. Кошечкин, В.А. Романов

Contribution of authors:

Concept of the article – Irina N. Zakharova, Irina S. Kuznetsova

Study concept and design – Irina N. Zakharova, Irina S. Kuznetsova

Text development – Irina S. Kuznetsova, Irina V. Berezhnaya

Collection and processing of material – Irina S. Kuznetsova, Vera E. Odintsova, Stanislav I. Koshechkin, Vladimir A. Romanov

Translation into English – Anastasia V. Makhaeva

Material analysis – Irina S. Kuznetsova, Tatyana A. Cherednikova, Anastasia V. Makhaeva, Vera E. Odintsova, Vladimir A. Romanov

Editing – Irina S. Kuznetsova, Irina V. Berezhnaya

Approval of the final version of the article – Irina N. Zakharova, Irina V. Berezhnaya, Irina S. Kuznetsova, Tatyana A. Cherednikova, Anastasia V. Makhaeva, Stanislav I. Koshechkin, Vladimir A. Romanov

Информация об авторах:

Захарова Ирина Николаевна, д.м.н., профессор, заслуженный врач России, заведующая кафедрой педиатрии имени академика Г.Н. Сперанского, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; 123242, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1; <https://orcid.org/0000-0003-4200-4598>; zakharova-rmapo@yandex.ru

Бережная Ирина Владимировна, к.м.н. доцент кафедры педиатрии имени академика Г.Н. Сперанского, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; 123242, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1; <https://orcid.org/0000-0002-2847-6268>; berezhnaya-irina26@yandex.ru

Кузнецова Ирина Сергеевна, ассистент кафедры педиатрии имени академика Г.Н. Сперанского, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; 123242, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1; <https://orcid.org/0000-0001-5164-682X>; doctor_irina_kuznetsova@mail.ru

Чередникова Татьяна Александровна, педиатр, главный врач Детской городской поликлиники №140; 127006, Россия, Москва, Оружейный пер., д. 43; dgp140@zdrav.mos.ru

Махаева Анастасия Владимировна, аспирант кафедры педиатрии, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; 123242, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1; заведующая педиатрическим отделением, Детская городская поликлиника №140; 127006, Россия, Москва, Оружейный пер., д. 43; <https://orcid.org/0000-0002-0006-5889>; avmakhaeva305@yandex.ru

Одинцова Вера Евгеньевна, главный биоинформатик, ООО «Нобиаз Технолоджис»; 123423, Россия, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1, помещ. 1/1; <https://orcid.org/0000-0003-1897-4033>; vera.odints@gmail.com

Кошечкин Станислав Игоревич, к.б.н., директор по науке, ООО «Нобиаз Технолоджис»; 123423, Россия, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1, помещ. 1/1; <https://orcid.org/0000-0002-7389-0476>; st.koshechkin@gmail.com

Романов Владимир Андреевич, менеджер клинических исследований, ООО «Нобиаз Технолоджис»; 123423, Россия, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1, помещ. 1/1; <https://orcid.org/0000-0002-7540-5884>; romanov@nobiastech.com

Information about the authors:

Irina N. Zakharova, Dr. Sci. (Med.), Honored Physician of Russia, Head of the Department of Pediatrics named after Academician G.N. Speransky, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; 2/1, Bldg. 1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4200-4598>; zakharova-rmapo@yandex.ru

Irina V. Berezhnaya, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pediatrics, Academician G.N. Speransky, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Bldg. 1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2847-6268>; berezhnaya-irina26@yandex.ru

Irina S. Kuznetsova, Assistant of the Department of Pediatrics named after Academician G.N. Speransky, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Bldg. 1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5164-682X>; doctor_irina_kuznetsova@mail.ru

Tatyana A. Cherednikova, Pediatrician, Chief Physician of the Children's City Polyclinic No. 140; 43, Oruzheyny Lane, Moscow, 127006, Russia; dgp140@zdrav.mos.ru

Anastasia V. Makhaeva, Postgraduate Student of the Department of Pediatrics of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Bldg. 1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia; Head of Pediatric Department, Children's City Polyclinic No. 140; 43, Oruzheyny Lane, Moscow, 127006, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0006-5889>; avmakhaeva305@yandex.ru

Vera E. Odintsova, Bioinformatics Lead, Nobias Technologies LLC; 34-1-1/1, Narodnogo Opolcheniia St., Moscow, 123423, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1897-4033>; vera.odints@gmail.com

Stanislav I. Koshechkin, Cand. Sci. (Biol.), Science Director, Nobias Technologies LLC; 34-1-1/1, Narodnogo Opolcheniia St., Moscow, 123423, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-7389-0476>; St.Koshechkin@gmail.com

Vladimir A. Romanov, Senior Researcher, Clinical Research Manager, Nobias Technologies LLC; 34-1-1/1, Narodnogo Opolcheniia St., Moscow, 123423, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-7540-5884>; romanovv@nobiastech.com