

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Lycaena thersamon (Esper, 1784)
Червонец блестящий
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.24-008.8.078

О.В. Кондратенко¹, А.В. Жестков¹, А.В. Лямин¹, С.В. Поликарпова²

МИКРОБИОТА РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

¹ Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

² ГБУЗ ГКБ №15 им. О.М. Филатова, Москва, Россия

Цель. Оценка структуры возбудителей, выделенных из респираторных образцов у пациентов с муковисцидозом (МВ) из различных регионов РФ за 2018 год.

Материал и методы. проведено исследование 1245 проб от 479 пациентов с МВ из 38 регионов РФ. В работе использовался классический микробиологический метод. Идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Результаты. В результате проведенного исследования выделено 4488 штаммов микроорганизмов. Доминирующее положение в структуре клинически значимых штаммов занимали неферментирующие грамотрицательные бактерии. Отмечалось широкое видовое разнообразие выделенных возбудителей.

Заключение. Структура бактериальных возбудителей при МВ уникальна и не встречается при других заболеваниях. Микробиологическое исследование респираторных образцов от пациентов с МВ должно осуществляться в специализированных лабораториях, с учетом особенностей метаболизма и сложностей идентификации выделенных штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: муковисцидоз, бактерии, нижние дыхательные пути, мокрота.

O. V. Kondratenko¹, A. V. Zhestkov¹, A. V. Lyamin¹, S. V. Polikarpova²

MICROBIOTA OF THE RESPIRATORY TRACT IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

¹ Samara State Medical University, Samara, Russia

² Children City Clinical Hospital named after O.M. Filatov, Moscow, Russia

The aim of the study was to assess the structure of pathogens isolated from respiratory samples in patients with cystic fibrosis (CF) from different regions of the Russian Federation in 2018.

Material and methods. A study of 1245 samples from 479 patients with CF from 38 regions of the Russian Federation. The classical microbiological method was used in the work. Identification of the isolated strains was performed using MALDI-TOF mass spectrometry.

Results. As a result of the study, 4488 strains of microorganisms were isolated. The dominant position in the structure of clinically significant strains was occupied by non-fermenting gram-negative bacteria. There was a wide species diversity of isolated pathogens.

Conclusion: the Structure of bacterial pathogens in CF is unique and does not occur in other diseases. Microbiological examination of respiratory samples from patients with CF should be carried out in specialized laboratories, taking into account the peculiarities of metabolism and difficulties in identifying the isolated strains.

Key words: cystic fibrosis, bacteria, lower respiratory tract, sputum.

Введение

Муковисцидоз (МВ) является самым распространенным наследственным заболеванием, обусловленным мутацией гена, расположенного на длинном плече 7 хромосомы, и передающимся по аутосомно-рецессивному типу при наследовании двух мутантных аллелей. В результате мутации гена происходит нарушение синтеза, структуры и функции белка трансмембранного регулятора проводимости МВ, что приводит к тому, что хлорные каналы становятся патологически непроницаемыми для ионов хлора при гиперабсорбции натрия и одновременном поступлении в клетку воды, что вызывает дегидратацию апикальной поверхности секреторного эпителия и приводит к увеличению вязкости слизи.

МВ является мультисистемной патологией, в которую в той или иной степени вовлекаются многие органы и системы пациента. При этом патология со стороны дыхательных путей является главной причиной развития осложнений и летальности. Поражение бронхолегочной системы вследствие накопления вязкого инфицированного секрета, вызывающего обструкцию и выраженную воспалительную реакцию, ведет к повреждению дыхательных путей и неуклонному снижению легочной функции.

Хроническая инфекция нижних дыхательных путей является одним из ключевых факторов, определяющих тяжесть клинического течения и прогноз данного заболевания. Микрофлора, вызывающая воспалительный процесс в легких при МВ, уникальна и практически не встречается при других заболеваниях, при этом ряд микроорганизмов проявляет атипичные для своего вида фенотипические свойства (SCV морфотипы *Staphylococcus aureus*).

В то же время действующая нормативная документация по бактериологии значительно устарела и не отвечает потребностям современной клинической микробиологической лаборатории. В том числе и по этим причинам микробиологическая диагностика бактериальных осложнений при МВ вызывает значительные трудности даже для бактериологов с большим опытом работы. Для корректного проведения исследования необходимо учитывать ряд важных особенностей, в том числе использование определенного перечня питательных сред, соблюдение сроков культивирования, а также учет метаболических особенностей микроорганизмов при идентификации [1]. Так, использование автоматических анализаторов, основанных на определении биохимической активности бактерий, не позволяет идентифицировать ряд мик-

роорганизмов, в том числе из-за их замедленного метаболизма и невозможности корректировки протокола исследования. Поэтому для идентификации микроорганизмов при МВ предпочтительно использование MALDI-ToF-масс-спектрометрии, а также «классических» биохимических методик.

Однако, наибольшее значение для проведения качественного микробиологического исследования при МВ, на наш взгляд, имеет наличие в лаборатории обученного (опытного) персонала, знающего специфику культивирования и клиническое значение бактерий, в том числе, и редких патогенов.

Актуальность и значимость корректной микробиологической диагностики при МВ в регионах РФ отмечена и в Национальном Консенсусе «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» (2019, 2 выпуск). Экспертами документа было принято решение о введении понятия «лаборатория экспертного уровня», в перечень которых включены организации, имеющие многолетний опыт квалифицированной практической и научной работы с биоматериалом от пациентов с МВ из различных регионов РФ.

На протяжении нескольких лет на территории РФ ведется Регистр пациентов с МВ, в котором помимо общеклинических данных и генетических особенностей больных отдельный раздел посвящен описанию микробиологического пейзажа возбудителей в целом по стране и отдельно по Федеральным округам.

При изучении микрофлоры нижних дыхательных путей детей с МВ различных возрастных групп исследователями из разных стран установлено, что основными возбудителями инфекции легких у больных МВ являются *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* и *Haemophilus influenzae*. Показано, что у детей с МВ первых лет жизни доминирует *S. aureus*, а у подростков и взрослых возрастает роль *P. aeruginosa* и других грамотрицательных бактерий [2, 3]. В последние десятилетия все большую клиническую значимость приобретают неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГОБ) – *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* и др., а также нетуберкулезные микобактерии (НМБ) и грибы [4]. При этом в большинстве случаев патологический процесс в легких ассоциирован с несколькими возбудителями [5, 6].

Материал и методы

За 2018 г. в Микробиологическом отделе КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ проведено

микробиологическое исследование 1245 проб биоматериала с дыхательных путей 479 пациентов с МВ из 38 регионов РФ.

Первичный посев материала осуществлялся на поверхность чашек с 5% кровяным агаром, шоколадным агаром, универсальной хромогенной средой, селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) с использованием техники посева «штрихом». Затем засеянные чашки с 5% кровяным агаром, универсальной хромогенной средой инкубировались в термостате при температуре 37⁰С в течение 24 часов с ежедневным просмотром посевов в течении 7 суток. Чашки с шоколадным агаром инкубировали при 35⁰С в атмосфере 5-7% CO₂ в течение 24-48 часов с ежедневным просмотром посевов в течении 7 суток. Засеянные чашки с селективной средой для *Burkholderia cepacia* (OFPBL-агар) инкубировали 24-48 часов при температуре 37⁰С, далее инкубировали до 28 суток при комнатной температуре с ежедневным просмотром посевов. На поверхность чашек с агаром Сабуро производился посев гомогенизированного материала методом бляшек с последующей инкубацией при 28⁰С до 14 суток с ежедневными просмотрами посевов.

Идентификация выделенных культур осуществлялась с помощью MALDI-Tof-масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker). Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили в соответствии с Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Москва, 2015).

Результаты и обсуждение

За исследованный период выделено 4488 штаммов микроорганизмов из 1245 респираторных образцов, из них 1790 (39,8%) культур представителей нормальной орофарингеальной флоры, не имеющей клинического значения при МВ.

В структуре грамположительной микрофлоры выделено 635 (14,1%) штаммов *S. aureus* (в том числе, 13 (2,0%) штаммов MRSA), 103 (2,3%) штамма *S. pneumoniae* и 53 (1,2%) штамма *Enterococcus spp.* Кроме того, выделено 20 (0,5%) штаммов НМБ.

Среди грамотрицательных бактерий доминирующее положение занимали НФГОБ – 965 (21,5%) штаммов. Среди них наиболее часто встречались представители рода *Pseudomonas* – 408 (42,3%) штаммов, из них преобладали штаммы *P. aeruginosa* (363 (88,9%) штамма) как в немуконидной форме (298 (82,1%) штаммов), так и в мукоидной (65 (17,9%) штаммов). Среди

немукоидных морфотипов 10 (3,6%) штаммов были продуцентами карбапенемаз, в то время как среди мукоидных морфотипов таким был лишь 1 (1,7%) штамм. Кроме того, было выделено 45 (11,1%) штаммов прочих представителей рода *Pseudomonas*.

На втором месте по частоте встречаемости среди НФГОБ были штаммы *Burkholderia cepacia* complex и *B. gladioli* – 148 (15,3%) штаммов. Структура буркхольдерий, выделенных от пациентов с МВ за 2018 г., представлена в таблице 1, из которой видно, что доминирующим геноваром является *B. cenoseracia*.

Таблица 1. Видовая структура бактерий рода *Burkholderia*, выделенных из респираторных образцов от пациентов с МВ за 2018 г.

№ п/п	Вид	Количество штаммов (абс.)	Доля от общего количества штаммов рода <i>Burkholderia</i> (%)
1	<i>B. cenoseracia</i>	128	86,5
2	<i>B. multivorans</i>	2	1,4
3	<i>B. stabilis</i>	3	2,0
4	<i>B. contaminans</i>	8	5,4
5	<i>B. vietnamensis</i>	1	0,7
6	<i>B. gladioli</i>	6	4,0

Кроме того, из респираторного тракта было выделено 84 (8,7%) штамма *S. maltophilia* и 54 (5,6%) штамма *A. xylosoxydans*. Структура других представителей НФГОБ представлена в таблице 2.

Также от больных МВ изолировано 348 (7,8%) штаммов представителей порядка *Enterobacterales*, чья структура представлена в таблице 3.

Среди выделенных штаммов энтеробактерий 50 (14,4%) оказались продуцентами БЛРС, в том числе 23 (46,0%) штамма *E.coli*, 9 (18,0%) штаммов *Klebsiella spp.*, 13 (26,0%) штаммов *Enterobacter spp.*, 3 (6,0%) штамма *Proteus spp.*, по 1 (2,0%) штамму *Pantoea spp.* и *Serratia spp.*

Кроме бактерий из респираторного тракта больных с МВ был изолирован 571 (12,7%) штамм грибов, из них 525 (91,9%) штаммов рода *Candida*, 41 (7,1%) – *Aspergillus spp.*, 2 (0,4%) – *Scopulariopsis spp.*, по 1 (0,2%) штамму *Yarrowia spp.*, *Rhodotorula spp.* и *Magnuseomyces spp.*

Таблица 2. Структура прочих НФГОБ, выделенных из респираторных образцов от пациентов с МВ за 2018 г.

№ п/п	Вид	Количество штаммов	Доля от общего количества НФГОБ (%)
1	<i>Chryseobacterium spp.</i>	40	4,1
2	<i>Sphingobacterium spp.</i>	15	1,6
3	<i>Sphingomonas spp.</i>	8	0,8
4	<i>Elizabethkingia spp.</i>	2	0,2
5	<i>Rhizobium spp.</i>	3	0,3
6	<i>Pandorae spp.</i>	1	0,1
7	<i>Acidovorax spp.</i>	1	0,1
8	<i>Delftia spp.</i>	4	0,4
9	<i>Kingella spp.</i>	12	1,2
10	<i>Wautersiella spp.</i>	10	1,0
11	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	0,9
12	<i>Acinetobacter spp.</i>	152	15,7
13	<i>Ochrobactrum spp.</i>	5	0,5
14	<i>Brevundimonas spp.</i>	8	0,8

Таблица 3. Структура штаммов представителей порядка *Enterobacteriales*, выделенных из респираторных образцов от пациентов с МВ за 2018 г.

№ п/п	Вид	Количество штаммов	Доля от общего количества штаммов <i>Enterobacteriales</i> (%)
1	<i>E. coli</i>	101	29,0
2	<i>Klebsiella spp.</i>	64	18,4
3	<i>Enterobacter spp.</i>	106	30,5
4	<i>Citrobacter spp.</i>	4	1,2
5	<i>Aeromonas spp.</i>	7	2,0
6	<i>Leclercia spp.</i>	5	1,4
7	<i>Pantoea spp.</i>	6	1,7
8	<i>Proteus spp.</i>	12	3,5
9	<i>Serratia spp.</i>	36	10,3
10	<i>Hafnia spp.</i>	2	0,6
11	<i>Morganella spp.</i>	5	1,4

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования нами был выявлен широкий перечень микроорганизмов, большинство из которых являются уникальными и не встречаются при других заболеваниях. Это обстоятельство необходимо учитывать бактериологам при работе с респираторными образцами от пациентов с МВ. Наибольшее значение в структуре выделенных штаммов имеют неферментирующие грамотрицательные бактерии, а также *S. aureus*.

Особого внимания требуют выделение и правильная идентификация штаммов родов *Burkholderia* и *Achromobacter* в силу их важного клинического значения, в том числе для определения прогноза при МВ.

Также следует учитывать, что ряд штаммов обладает способностью к продукции бета-лактамаз. Отдельное внимание необходимо уделять выделению и идентификации не только дрожжевых, но и плесневых грибов, имеющих клиническое значение при МВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Алексеева Г.В., Авакян Л.В., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Семькин С.Ю., Сиянова Е.А., Медведева О.С., Красовский С.А., Усачева М.В., Кондратьева Е.И., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом. *Клин. Микробиол. Антимикроб. Химотер.* 2014. Т. 16, №4: 276-290.
2. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю. и др. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2009. 5: 15-20.
3. Hauser A.R., Jain M., Bar-Meir M., McColley S.A. Microbes and outcomes in cystic fibrosis. *ClinMicrobiol. Rev.* 2011. 24: 1-70.
4. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. *Клин. Микробиол. Антимикроб. Химотер.* 2005. 7 (3): 271-285.
5. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Капранов Н.И., Алексеева Г.В., Каширская Н.Ю., Аветисян Л.Р., Семькин С.Ю., Данилина Г.А., Поликарпова С.В., Пивкина Н.В. Персистенция *Burkholderia ceracia* у больных муковисцидозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012. № 4: 93-98.
6. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Семькин С.Ю., Аветисян Л.Р., Каширская Н.Ю., Пивкина Н.В., Данилина Г.А., Батов А.Б., Бусуек Г.П. Особенности микрофлоры нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей больных муковисцидозом. *Материалы X национального конгресса «Муковисцидоз у детей и взрослых (20 лет Российскому центру муковисцидоза)».* Ярославль, 2011: 64-71.

Поступила 19 августа 2019 г.

(Контактная информация: Кондратенко Ольга Владимировна – к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; адрес: 443086, г. Самара, ул. Мичурина 148-125, тел.: 89272005500, E-mail: helga1983@yandex.ru)

LITERATURE

1. Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A., Alekseeva G.V., Avakyan L.V., Kashirskaya N.Yu., Kapranov N.I., Semykin S.Yu., Siyanova E.A., Medvedeva O.S., Krasovsky S.A., Usacheva M.V., Kondratyeva E.I., Amelina E.L., Chuchalin A.G., Gunzburg A.L. Algorithm of microbiological diagnosis of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Antimicrobe. Chemotherapy*. 2014. Vol. 16, No. 4: 276-290.
2. Shaginyan I.A., Kapranov N.I., Chernukha M.Yu. et al. Microbial landscape of the lower respiratory tract in various age groups of children with cystic fibrosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2009. №5: 15-20.
3. Hauser A.R., Jain M., Bar-Meir M., McColley S.A. Microbes and outcomes in cystic fibrosis. *ClinMicrobiol. Rev.* 2011. 24: 1-70.
4. Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu. Non-fermenting gram-negative bacteria in the etiology of nosocomial infections: clinical, microbiological and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Antimicrobe. Chemotherapy*. 2005. 7 (3): 271-285.
5. Chernukha M.Yu., Shaginyan I.A., Kapranov N.I., Alekseeva G.V., Kashirskaya N.Yu., Avetisyan L.R., Semykin S.Yu., Danilina G.A. , Polikarpova S.V., Pivkina N.V. Persian stentia of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2012. № 4: 93-98.
6. Shaginyan I.A., Kapranov N.I., Chernukha M.Yu., Alekseeva G.V., Semykin S.Yu., Avetisyan L.R., Kashirskaya N.Yu., Pivkina N.V. , Danilina G.A., Batov A.B., Busuek G.P. Features of the microflora of the lower respiratory tract in various age groups of children with cystic fibrosis. *Materials of the X national congress "Cystic fibrosis in children and adults (20 years old to the Russian Center for Cystic Fibrosis)." Yaroslavl, 2011: 64-71.*

Образец ссылки на статью:

Кондратенко О.В., Жестков А.В., Лямин А.В., Поликарпова С.В. Микробиота респираторного тракта у пациентов с муковисцидозом. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019. №3. 7с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-3/Articles/KOV-2019-3.pdf>). DOI: **10.24411/2304-9081-2019-13008**