

Эпидемиологические особенности хронической инфекции легких у больных муковисцидозом

И. А. Шагинян¹ (shaginyan@gamaleya.org), М. Ю. Чернуха¹, Л. Р. Аветисян¹,
Е. А. Сиянова¹, Д. Г. Кулястова¹, О. С. Медведева¹, Т. В. Припутневич²,
Д. Ю. Трофимов², А. В. Гордеев², Е. И. Кондратьева³, Е. Л. Амелина⁴, С. А. Красовский⁴

¹ФГБУ «ФНИЦ ЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» Минздрав России, Москва

²ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрав России

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

⁴ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва

Резюме

Цель исследования – представить данные о эпидемиологических особенностях вызванной разными видами бактерий хронической инфекции легких у больных муковисцидозом.

Установлено, что при хронической инфекции легких, вызванной *S. aureus* и *P. aeruginosa*, возбудителей можно успешно эрадикаровать с помощью антимикробной терапии, что невозможно в случае, когда возбудители инфекции бактерии комплекса *B. cepacia* и *Achromobacter spp.* Хроническая инфекция легких, вызванная бактериями видов *S. aureus* и *P. aeruginosa*, характеризуется многообразием генотипов, как внебольничным, так и внутрибольничным приобретением возбудителя инфекции. В то же время хроническая инфекция, вызванная бактериями комплекса *B. cepacia* и *Achromobacter spp.*, является типичной госпитальной инфекцией, и больные муковисцидозом заражаются в больничных стационарах при передаче возбудителя от больного к больному.

Хроническая инфекция легких у больных муковисцидозом сложное динамическое заболевание, требующее постоянного мониторинга в связи с возможными различными механизмами изменчивости возбудителя для проведения адекватного лечения больных и инфекционного контроля в больничных стационарах.

Ключевые слова: хронической инфекции легких, муковисцидоз, мониторинг, внебольничные и внутрибольничные возбудители инфекции

Epidemiological Features of Chronic Lung Infection in Patients with Cystic Fibrosis

I. A. Shaginyan¹ (shaginyan@gamaleya.org), M. Yu. Chernukha¹, L. R. Avetisyan¹, E. A. Siyanova¹, D. G. Kulyastova¹, O. S. Medvedeva¹,
T. B. Priputnevich², D. Yu. Trofimov², A. V. Gordeev², E. I. Kondratieva³, E. L. Amelina⁴, S. A. Krasovskiy⁴

¹Federal State Budgetary Institution «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the Honorable Academician N.F. Gamaleya» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Federal State Budgetary Institution «Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakova» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³The Federal State Budget Scientific Institution «Medical Genetics Scientific Center» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁴Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Pulmonology» Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow

Abstract

Relevance. Life expectancy of cystic fibrosis patients mostly depends on the degree of respiratory system damage caused by opportunistic microorganisms, which is due to the fact that 90-95% of deaths of cystic fibrosis patients are caused by lung infections.

Goal. To define epidemiologic characteristics of chronic lung infection caused by the most common agents (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*-like bacteria (*Bcc*) and *Achromobacter spp.*) using a novel chronic lung infection in cystic fibrosis patients microbiological diagnosis algorithm.

Materials and methods. Over a period of 7 years (2008–2016) 300 children with cystic fibrosis living in Moscow, Moscow region and several other regions of Russian Federation have been checked-up. 260 sputum samples from 100 adult patients, who were under care at the Pulmonology Research Institute, were studied. Sputum samples from children were taken before and after antibiotic therapy with intervals of 15–45 days and over 6 months. 30 of the children were also subjected to a microbiologic monitoring of the state of chronic infection in the period between 4 and 15 months. Sputum sample from adult patients were also taken before and after antibiotic therapy with intervals of 0, 15–45 days and over 6 months.

Results. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* and *Burkholderia cepacia*-like bacteria were confirmed to be the most common agents of lung infection in cystic fibrosis patients.

Children with cystic fibrosis over the years develop foci of chronic lung infection, mainly caused by *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Conclusions. Chronic lung infection can be caused by community-acquired or nosocomial *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Chronic lung infection is a complex, dynamically changing disease which requires constant monitoring and is mainly caused by *S. aureus*, *P. aeruginosa*, Bcc bacteria and *Achromobacter* spp. As populations of the agents can be diverse, it is necessary to study all colonies with differing phenotypes (mucoid and non-mucoid variants, small colony variants, variants with different pigments) and to take samples of several colonies when testing antibiotic resistance. Bcc and *Achromobacter* spp. cannot be eradicated with antibiotics, thus the only effective measure against these bacteria can only be vaccination which requires developing a vaccine.

Key words: chronic lung infection, cystic fibrosis, monitoring, community-acquired or nosocomial infection

Введение

Муковисцидоз, или кистозный фиброз (*cystic fibrosis*) является наследственным аутосомно-рецессивным заболеванием, частота распространенности которого в России составляет 1:10 000 новорожденных [1]. Продолжительность жизни больных муковисцидозом в основном зависит от степени поражения органов дыхания условно-патогенными микроорганизмами, в связи с тем, что основной причиной летальных исходов у 90 – 95% больных муковисцидозом являются инфекционные процессы в легких. В настоящее время средняя продолжительность жизни в странах Европы и Америки превышает 45-летний рубеж, а в России в 2015 г., по данным регистра Российской Федерации московского региона, составляет более 39,5 лет [1].

Микроорганизмы, инфицирующие нижние дыхательные пути больного муковисцидозом (МВ), определяют лечение, качество жизни, перспективы для трансплантации и общую выживаемость. Продолжительность течения хронической инфекции легких в большинстве случаев составляет от нескольких до 2–3 десятков лет и одной из основных задач лечащих врачей является разработка методов лечения, направленных на увеличение длительности течения хронической инфекции легких.

Лечащих врачей и исследователей интересуют вопросы, вызванные длительностью персистенции основных возбудителей в легких больных муковисцидозом: насколько стабильна и постоянна популяция возбудителя; происходят ли какие-либо изменения в микроорганизме; от чего может изменяться эпидемиология хронической инфекции и какой должна быть тактика лечения инфекции легких? Поэтому выявление особенностей персистенции основных возбудителей в легких больных муковисцидозом важно не только для выработки тактики лечения больных, но и для выяснения ряда важных вопросов эпидемиологии хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Нами ранее было показано, что выяснение данных вопросов возможно только на основе точной и своевременной идентификации возбудителей инфекций дыхательных путей, которая значима для обеспечения своевременного начала лечения соответствующими антибиотиками с целью элиминации бактериальных патогенов и организации надлежащего инфекционного

контроля для профилактики распространения патогенных микроорганизмов среди больных МВ.

Цель данной работы – с помощью разработанного нами алгоритма микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом [2] выявить эпидемиологические особенности хронической инфекции легких, вызванной основными возбудителями (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, бактерий комплекса *B. cepacia* (Bcc) и *Achromobacter* spp.).

Материалы и методы

В динамике на протяжении 7 лет (2008 – 2016 гг.) обследовано 300 больных муковисцидозом детей, жителей Москвы и Московской области и ряда регионов Российской Федерации. Большинство из детей проходили лечение в отделении медицинской генетики Российской детской клинической больницы (РФКБ) или находились на амбулаторном лечении в Московском центре муковисцидоза на базе ГДКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова [3, 4]. Кроме того исследованы 260 образцов мокроты от 100 взрослых больных, наблюдавшихся в НИИ пульмонологии ФМБА.

У детей образцы мокроты брали до и после антибиотикотерапии с интервалом 15–45 дней и более 6 месяцев, у 30 детей из общего числа был проведен также микробиологический мониторинг течения хронической инфекции в период от 4 до 15 месяцев. У взрослых больных образцы мокроты также брали до и после антибиотикотерапии с интервалом 0, 15–45 дней и более 6 месяцев.

Для идентификации *S. aureus* использовали желточно-солевой агар и 5% кровяной агар, тест на плазмокоагулазу, коммерческие тест-системы StaphyloTest 16 «Lachema» или «BioMerieux» API Staph. Для определения бактерий *P. aeruginosa* высевали мокроту на селективную среду – цитримид-агар, 5% кровяной агар, проводили тест на оксидазу, наличие пигмента, характерного запаха (винограда или земляничного мыла), использовали коммерческой тест-системы API 20NE «BioMerieux». Энтеробактерии идентифицировали высевом мокроты на агары Эндо, Макконки, Гектоен (Himedia). Для идентификации бактерий Bcc (*B. cepacia* complex) использовали разработанный алгоритм идентификации и типирования [2], включающий 2 последовательных этапа исследования: применение бактериологических, биохимических и других

фенотипических методов (выявление гемолиза, способности образования биопленки) и молекулярно-биологических методов. Все штаммы были идентифицированы с помощью коммерческих тест-систем: API 20NE «BioMerieux», 24 NE «Lachema» в соответствии с инструкцией производителя. Рост на селективном агаре для *Bcc* – *Burkholderia cepacia* selective agar, наблюдали при $t = 37^\circ\text{C}$ через 24 ч. и при $t = 30^\circ\text{C}$ через 48 ч.

Чувствительность к антимикробным препаратам определяли в соответствии с МУК 4.2.1890-04 методом серийных разведений в бульоне [5] с использованием АТВ-стрипов для стафилококков и синегнойной палочки «BioMerieux». Антибиотики были выбраны в соответствии с рекомендациями для лечения заболеваний, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями [6]. Генотипирование штаммов проводили методом RAPD-ПЦР со случайным олигонуклеотидным праймером, размером 10 нуклеотидов Sh1 (Short 1) – AATCGGGCTG. Для определения *Bcc* использовали ПЦР гена *recA*, специфичного для бактерий комплекса *Bcc*, с праймерами BCR1 – 5`TGACCGCCGAGAAGAGCAA и BCR2 5`CTCTTCTTCGTCATCGCCTC [7]. Определение генома проводили с помощью ПЦР с геномвар-специфическими праймерами согласно методам, описанным в работах Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R. с соавт. (1999), Mahenthiralingam E., Bishof J., Byrne S. K. с соавт. (2000). Для идентификации *Achromobacter xylosoxidans* использовали праймеры на локус 16S рДНК AX-F1-5`GCAGGAAAGAAACGTCGCGGGT-3`и AX-B1 – 5`-ATTTACATCTTTCTTTCCG-3` [8].

Мультилокусное секвенирование *Bcc*, *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. проводили как описано [9].

Полногеномное секвенирование *S. aureus*, *Bcc*, *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp. проводили в соответствии с [10, 11].

Результаты и обсуждение

В международных исследованиях и наших (2005 – 2006 гг.) было установлено, что доминирующими возбудителями инфекции легких у больных муковисцидозом являются *P. aeruginosa* и *S. aureus*, *H. influenzae*, а также бактерии комплекса *Bcc* [3].

Согласно международным рекомендациям, инфекция, вызванная *P. aeruginosa*, может быть отнесена к хронической, если патоген выявляется 2 и более раз в течение 6 месяцев. Аналогичными критериями можно руководствоваться при выявлении у больного в монокультуре *S. aureus* и *Bcc*, а также при смешанной инфекции. При анализе данных микробиологических исследований установлено, что микроорганизмы выделяются у 61,9% детей в возрасте до 1 года, у 92,9% – 1–4 года, у 93,8% – 5–7 лет и в возрасте 8–14 и 15–18 лет у 100% детей. Это свидетельствует о том, что колонизация легких микроорганизмами больных

муковисцидозом начинается фактически с первых дней жизни и достигает максимума уже к 5-летнему возрасту. При этом, если в возрастной группе до 1 года *S. aureus* выявляется только у 28,6% детей, а *P. aeruginosa* – у 19%, то в возрасте 5–7 лет золотистый стафилококк обнаружен у 87,5% детей, а *P. aeruginosa* – у 31,2% детей. Таким образом, в возрасте до 1 года более чем у трети больных муковисцидозом нижние дыхательные пути еще не обсеменены микроорганизмами. Хроническая стафилококковая, синегнойная или смешанная инфекция начинает диагностироваться у 25% детей уже в возрасте 1–4 лет, в 5–7 лет – у 50%, в 8–14 лет – у 65% и к 18 годам – у 80% больных муковисцидозом [3, 8].

Установлено, что в 65% случаев хроническая инфекция легких вызывается не монокультурой, а ассоциацией микроорганизмов, причем у госпитализированных больных, в отличие от амбулаторных пациентов, эти ассоциации представлены, как правило, тремя и более видами микроорганизмов. За рубежом эти показатели в два раза ниже – в 35% исследуемых образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) выявляют рост двух микроорганизмов и в 10% случаев ассоциации представлены тремя и более видами микроорганизмов. Наиболее часто встречающейся ассоциацией является сочетание *P. aeruginosa* + *S. aureus* (18,2%), а также *P. aeruginosa* + *Bcc* (9, 1%) [3, 8]. В составе ассоциаций, кроме *P. aeruginosa*, часто выделяли других представителей неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов – *S. maltophilia*, *A. baumannii* [8], что, вероятно, обусловлено тропизмом этих видов микроорганизмов к легочной ткани. Полученные данные послужили основанием для заключения, что для больных муковисцидозом характерна смешанная инфекция [6].

Таким образом, при анализе микрофлоры детей больных муковисцидозом, можно утверждать, что по мере взросления у больных формируются постоянные очаги хронической легочной инфекции, основными возбудителями которой являются *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

При мониторинге бактериальной микрофлоры у госпитализированных больных с хронической инфекцией при использовании курсов антимикробной терапии нами установлено, что в более раннем возрасте наблюдается преобладание *S. aureus*, а затем доминирующим возбудителем становится *P. aeruginosa*. Данные показатели могут быть следствием двух причин: больные со стафилококковой инфекцией умирают и инфицированных этим возбудителем становится меньше или во время лечения стафилококковой хронической инфекции происходит эрадикация возбудителя и его место занимает *P. aeruginosa*.

В связи с этим мы провели исследование по эрадикации возбудителя после курса химиотерапии больных хронической инфекцией

легких, вызванных разными видами возбудителей. Перед началом курса антибиотикотерапии у больных выделяли соответствующий возбудитель, а затем после курса антимикробной терапии вновь осуществляли посевы для выявления возбудителя. Как видно из таблицы 1 у обследованных, у которых перед антибиотикотерапией выявили золотистый стафилококк, после антибиотикотерапии возбудитель обнаруживался только у 25% обследованных больных, а у 75% больных наблюдалась эрадикация возбудителя. Однако через 14–45 дней возбудитель обнаруживали у 44%, а через 6 месяцев – у 74% больных. У больных с *P. aeruginosa* сразу после курса терапии выявляли возбудитель у 41% больных, через 14–45 дней у 35% и через 6 месяцев у 59% больных. Что касается *Bcc* и *Achromobacter* spp., то сразу после антибиотикотерапии выявляли возбудитель у 75% больных, однако через 6 месяцев и более возбудитель выявляли у всех больных. Таким образом, можно сказать, что с помощью антимикробной терапии возможно истинно эрадицировать только золотистый стафилококк и синегнойную палочку. Как можно видеть бактерии *Bcc* и *Achromacter* эрадицировать невозможно. В этих наблюдениях мы можем видеть и результаты ложной эрадикации, которая у золотистого стафилококка достигает 50%, а у синегнойной палочки – 18%. Полученные результаты мы объясняем следующим образом (рис. 1). При лечении антимикробными препаратами популяция возбудителя значительно уменьшается и микроорганизм невозможно определить стандартным микробиологическим методом. При этом больному становится значительно лучше, наступает ремиссия, так как синегнойная палочка и бактерии *Bcc* не вырабатывают

факторы патогенности и не проявляют своих патогенных свойств, в связи с тем, что для активности системы «кворум сенсинг», которая управляет синтезом факторов патогенности у этих возбудителей необходима концентрация возбудителя в 10^5 и более.

После отмены антимикробного препарата оставшаяся часть популяции возбудителя в отсутствие селекции увеличивается в количестве превышающем 10^5 , и она вновь может вызывать обострение хронической инфекции легких и быть выявленной стандартным микробиологическим методом. Таким образом, наблюдается определенное волнообразное течение хронической инфекции легких. Причем при инфицировании золотистым стафилококком и синегнойной палочкой мы способны эрадицировать возбудитель в какой-то из циклов лечения обострения. В определенном проценте случаев, как показывают наши данные, при истинной эрадикации *S. aureus* и *P. aeruginosa* происходит замена одного штамма на другой того же вида, но другого генотипа, или смена возбудителя одного вида на другой вид. Таким образом в более раннем возрасте доминирует золотистый стафилококк, в более позднем – при первичной эрадикации золотистого стафилококка и при повторной колонизации синегнойной палочкой – наблюдается преобладание *P. aeruginosa*. Отслеживая истинную эрадикацию *S. aureus* и *P. aeruginosa*, ни в одном случае не обнаруживали эрадикацию бактерий *Bcc* и *Achromobacter* spp.

Таким образом, результаты мониторинга течения хронической инфекции легких у больных муковисцидозом четко показывают, что инфекция не носит стабильный характер, а характеризуется волнообразным течением с повторяющимися циклами

Рисунок 1.
Динамика течения хронической инфекции легких у больных муковисцидозом

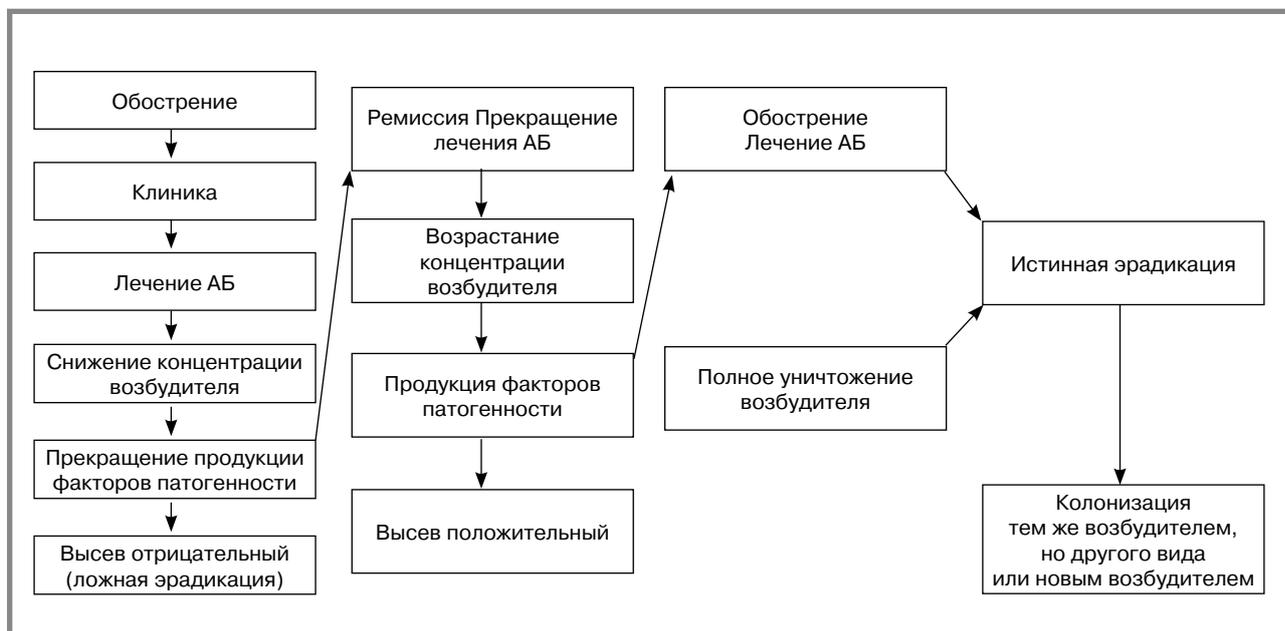


Таблица 1.
Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом

Возбудитель	Процент положительных высевов			Истинная эрадикация
	сразу после антибиотикотерапии	14–45 дней	6 месяцев и более	
<i>S. aureus</i>	26	44	74	26
<i>P. aeruginosa</i>	41,2	35	59	41
<i>B. cepacia complex</i>	75	100	100	0
<i>Achromobacter spp.</i>	75	55	100	0

обострения и ремиссии. Антимикробная терапия может быть эффективна в борьбе с хронической инфекцией, вызванной *S. aureus* и *P. aeruginosa*, в случае *Bcc* и *Achromobacter spp.* речь может идти только о продлении ремиссии, элиминация данных возбудителей невозможна.

Используя различные методы, мы изучали эпидемиологическую значимость штаммов основных возбудителей хронической инфекции легких. С помощью фенотипических методов установили, что бактерии *Bcc* и *Achromobacter* – на 100% полирезистентные штаммы, *P. aeruginosa* – на 80%, а *S. aureus* – на 34%. Способны формировать биопленки 60–80% бактерий *Bcc* и *P. aeruginosa*, в меньшей степени золотистый стафилококк (35–40%). Гипермутабельными свойствами обладали 10% штаммов синегнойной палочки: из них 7% выделены от больных детей и 13% от взрослых пациентов.

При исследовании генотипических признаков установлено доминирование сиквенс-типов ST709 и ST208 среди штаммов *B. cepacia* и ST36 *Achromobacter ruhlandii* и многообразие генотипов золотистого стафилококка и синегнойной палочки. При этом штаммы сиквенс-типа ST709 обнаруживались в Республиканской детской больнице и в отделении муковисцидоза НИИ пульмонологии, сиквенс-типа ST208 в Самарской детской больнице, а *B. cepacia vietnamiensis* в больнице св. Ольги в Санкт-Петербурге, штаммы *Achromobacter ruhlandii* ST36 в Республиканской детской больнице и в отделении муковисцидоза НИИ пульмонологии. Эти данные свидетельствуют о том, что хроническая инфекция легких, вызванная *Bcc* и *Achromobacter spp.*, является типичной внутрибольничной инфекцией [6] и нами доказана передача *B. cepacia* ST709 от больного больному, проходившим лечение в отделении генетики Республиканской детской больницы. В отделении муковисцидоза НИИ пульмонологии ФМБА выявляли больных с сиквенс-типом *B. cepacia* ST709, который пациенты приобрели еще в РФКБ, находясь на лечении обострения хронической инфекции легких.

В то же время более 82% штаммов синегнойной палочки имели индивидуальный генотип и только 8% относились к сиквенс-типу ST235 – широко

известному госпитальному штамму, распространенному в госпиталях многих стран Европы и Азии.

Достаточное количество генотипов выявлено и у золотистого стафилококка. На основании выявления самых разнообразных генотипов у штаммов синегнойной палочки и золотистого стафилококка можно сделать вывод, что данные возбудители как источники инфекции имеют различное происхождение и больные заражаются ими как в стационарах, так и вне их, например, штаммом *P. aeruginosa* сиквенс-типа ST235.

Таким образом, хроническая инфекция легких, вызванная *S. aureus* и *P. aeruginosa*, может иметь как госпитальное, так и вне госпитальное происхождение и больные муковисцидозом могут заражаться фактически с рождения, где источником инфекции могут быть медперсонал, родители, вода, фрукты, овощи, хотя вероятнее основной источник – люди, так как носителями *S. aureus* и *P. aeruginosa* являются 40% и 10–20% здоровых людей соответственно. Что касается бактерий *Bcc* и *Achromobacter spp.*, то это типичные возбудители госпитальной инфекции и основной источник – это больной человек, выделяющий микроорганизм во внешнюю среду. В 2005–2006 гг. в РФКБ была вспышка инфекции, вызванная *B. cepacia*, когда возбудитель был обнаружен почти у половины госпитализированных больных. После принятия противоэпидемиологических мероприятий, направленных на изоляцию больных с *B. cepacia* в отдельных палатах, в течение полугода показатель выявления больных с хронической инфекцией легких, вызванной *B. cepacia*, снизились в 3–4 раза.

Еще одной из эпидемиологических особенностей хронической инфекции легких является изменчивость вызывающих ее возбудителей, которая направлена на сохранение возбудителя в легких больных.

При проведении мониторинга хронической инфекции легких у больных муковисцидозом выявлено 3 основных варианта изменчивости основных возбудителей хронической инфекции легких.

Первый вариант изменчивости проявляется в гетерогенности популяции возбудителя. В одном посеве присутствовали бактерии с разной

морфологией (мукоидные и немуконидные, мелкие колонии, с разным пигментом и разной устойчивостью к антибиотикам). В таблице 2 приведены данные обследования 35 недоношенных детей с вентилятор-ассоциированной пневмонией в возрасте 5–12 дней весом 600–2500 г. [12]. У всех была диагностирована острая госпитальная инфекция, вызванная в 83% случаев синегнойной палочкой. При микробиологическом анализе не наблюдалось никаких отклонений в морфологии колоний, пигментообразовании и спектрах устойчивости к антибиотикам. Все характеристики были типичными. Среди штаммов были выявлены 3 генотипических варианта госпитальных штаммов синегнойной палочки, каждый с определенным спектром устойчивости к 16, 12 и 9 антибиотикам соответственно.

В 40% случаев популяция синегнойной палочки, вызвавшая хроническую инфекцию легких, была гетерогенной. Штаммы *P. aeruginosa* характеризовались разной морфологией колоний и разным спектром устойчивости к антибиотикам, 18% штаммов были мукоидного фенотипа. При этом штаммы с разной морфологией, мукоидного и немуконидного фенотипов и с разными спектрами устойчивости к антибиотикам принадлежали, как правило, к одному генотипу или сиквенс-типу. Среди штаммов выделенных с острой катетер-ассоциированной инфекцией не обнаружено штаммов, обладающих гипермутабельными свойствами, тогда как 10% штаммов, выделенных от больных с хронической инфекцией легких, были гипермутабельными свойствами. В зависимости от длительности хронической инфекции легких гетерогенность популяции была не очень значительной при небольшом сроке хронической инфекции (до года) – 10%, при более и длительном (1–4 лет) – 15–20% и возростала до 40–45% у больных с длительностью инфекции свыше 5 лет. Полагаем, что выявленная гетерогенность популяции возбудителя направлена на борьбу за выживание в легких больных с муковисцидозом.

Второй вариант выражается в смене генотипа возбудителя и при этом отмечается замещение одного возбудителя другим, что наблюдалось при мониторинге эффективности лечения антимикробными препаратами больных муковисцидозом с хронической инфекцией легких. Анализ результатов мониторинга в течение 2 – 8 лет показал смену генотипа почти в 80% случаев инфекции, вызванной золотистым стафилококком. У 20% больных сохранялся тот же генотип и значит, что хроническую инфекцию постоянно вызывал первоначальный штамм. При замене первоначального штамма на новый вариант золотистого стафилококка, можно говорить, что после эрадикации наблюдалась повторная колонизация другим штаммом, который как бы «возвращал» хроническую инфекцию.

При синегнойной инфекции у 17 из 21 больного генотип оставался неизменным. При *V. seracía* ни в одном случае не наблюдали замены штамма, в легких постоянно персистировал первоначальный штамм.

Таким образом, при истинной эрадикации возбудителей *S. aureus* и *P. aeruginosa*, в определенном проценте случаев, как показывают наши данные, происходит замена одного штамма на другой того же вида, но другого генотипа или смена возбудителя одного вида на другой вид. Именно этим мы объясняем доминирование стафилококков в раннем и преобладание синегнойной палочки в более позднем возрасте. Наличие данного варианта изменений – смена возбудителя одного генотипа на другой генотип и на ряду с этим смена видов возбудителя настоятельно требует постоянного микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. От результатов мониторинга во многом будет зависеть тактика лечения конкретного больного, а также возможные противоэпидемические мероприятия как в стационаре, где больной проходит лечение, так и по месту его постоянного проживания.

Третий вариант изменчивости – микроразволюция возбудителя, происходящая в легких больного.

Таблица 2.
Основные свойства штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных с острой катетер-ассоциированной пневмонией и хронической инфекцией легких у больных муковисцидозом

Нозоформа	Число обследованных больных	Тип инфекции	Возбудитель	Фенотипическая гетерогенность	Генотипическая гетерогенность
Катетер-ассоциированная пневмония	35	Острая (внутрибольничная)	<i>P. aeruginosa</i> (83%)	100% гомогенность колоний, спектра устойчивости к антибиотикам	3 основных генотипа: один генотип у одного больного
Хроническая инфекция легких	160	Хроническая (как внутрибольничная, так и внебольничная)	<i>P. aeruginosa</i> (38%)	40% гетерогенность колоний, спектров устойчивости к антибиотикам, мукоидный (18%) фенотип	Разнообразие генотипов: один генотип или сиквенс-тип у одного больного

Эти данные получены нами с помощью полногеномного секвенирования.

Ниже представлены три примера, демонстрирующие микроэволюцию каждого из основных видов возбудителей хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Нами проанализировано более 20 штаммов основных видов возбудителей, выделенных с интервалом от двух недель до 6,2 лет от больных.

Первый пример. Нами анализировались штаммы *B. cepose*, выделенные с интервалом в 2 недели от больного с хронической инфекцией легких.

Штамм *B. cepose*, выделенный в 1-й день пребывания больного в стационаре был чувствителен к бисептолу и больному было назначено лечение этим антимикробным препаратом. Через 2 недели был выделен штамм того же сиквенс-типа, но уже устойчивый к бисептолу. У первоначального штамма не обнаружено генов устойчивости к сульфаниламидам, а у второго штамма такой ген *sull* был выявлен в геноме. Полногеномное секвенирование показало, что хромосомные гены были идентичны и у первого, и у второго штамма, но второй штамм получил в составе интегрона ген устойчивости к бисептолу (рис. 2), вследствие чего первоначальный штамм уже через 2 недели после пребывания больного в стационаре стал устойчивым к бисептолу. К сожалению, нам не удалось выявить микроорганизм, вероятно, циркулировавший в стационаре, явившийся источником этого гена и интегрона.

Второй пример. Исследованы 2 штамма *P. aeruginosa*, выделенные от больного с хронической инфекцией легких. Второй штамм того же сиквенс-типа и той же серогруппы был выделен через 6 лет после выделения первичного штамма. С помощью программы Blast проанализированы

результаты выравниваний нуклеотидных последовательностей десяти наиболее длинных контигов генома одного штамма на нуклеотидные последовательности другого штамма. Практически полное отсутствие однонуклеотидных замен говорит о том, что это, несомненно, один штамм (рис. 3). У второго штамма по сравнению с первым появилось как минимум два новых гена резистентности к антибиотикам. Так как эти два гена имеют плазмидную локализацию, то логично предположить, что штамм приобрел плазмиду. Обнаружено, что на 100% длины контига (7365 н.п.) выявлен уровень идентичности – 99% с участком уже описанной плазмиды *Klebsiella pneumoniae* plasmid pKp848CTX (LM994717.1). Значит, эта плазида и появилась в рассматриваемый период у больного и «перенесла с собой» ряд генов резистентности. Следует отметить, что за 6 лет были также выявлены изменения и в хромосомных генах и обнаружены изменения хромосомного генома у второго штамма почти на 10%. Штамм стал гипермутабельным, начали функционировать гены, обеспечивающие благоприятное существование возбудителя в легких больного (гиперпродукция альгината, снижение чувствительности к карбапенемам и ряд других признаков).

Третий пример. Штамм *S. aureus*, у которого фенотипическим методом была выявлена устойчивость к метициллину, однако ген *mec* методом ПЦР не был обнаружен ни в нашей лаборатории и ни в лаборатории микробиологии ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова». Полногеномное секвенирование также не выявило гена *mec* в геноме данного штамма золотистого стафилококка, в связи с чем мы полагаем, что устойчивость к метициллину обеспечивается не *mec*-геном, а определенными генами, локализованными в хромосоме данного штамма.

Рисунок 1. Зависимость иммуногенности и протективности препаратов от их молекулярной массы

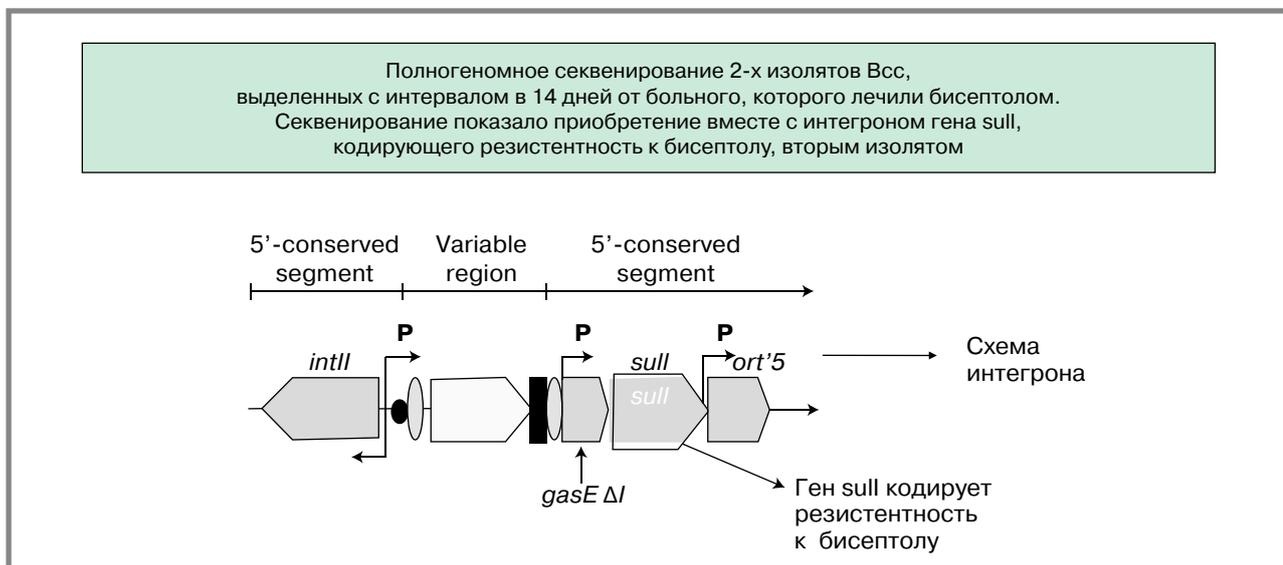
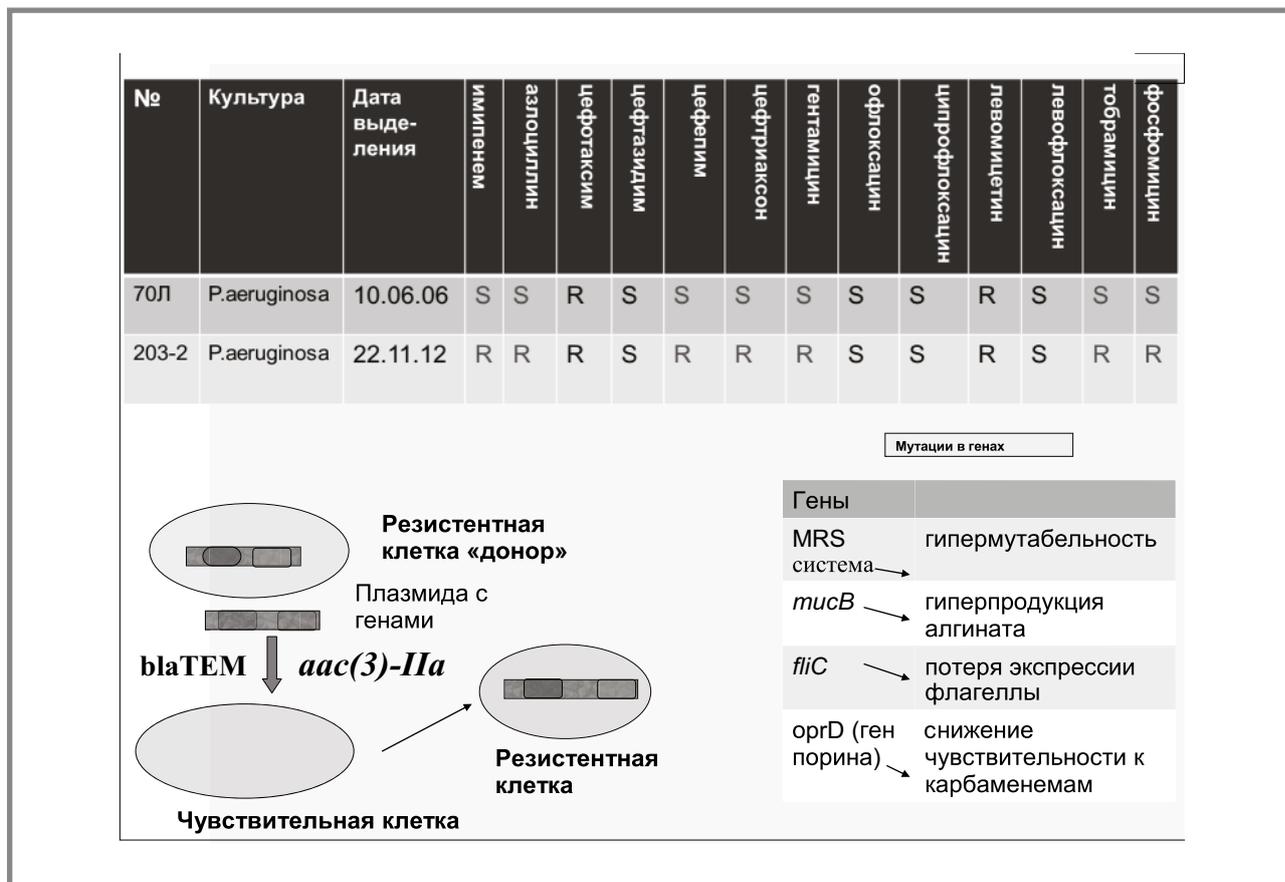


Рисунок 3.

Спектр устойчивости к антибиотикам у штаммов 70Л и 203-2, плазида *Klebsiella pneumoniae* plasmid pKp848CTX (LM994717.1) и изменения в хромосомных генах штамма 203.2.



Таким образом, нами получены новые данные, свидетельствующие о том, что устойчивость к метициллину не обязательно обусловлена *tes*-геном.

Выводы

1. Хроническая инфекция легких – это сложное динамическое заболевание, требующее постоянного мониторинга, основные возбудители которого – *S. aureus*, *P. aeruginosa*, бактерии *Vcc* и *Achromobacter* spp. Возбудители характеризуются гетерогенностью популяции, в связи с чем при анализе посевов возбудителя необходимо изучать все фенотипически измененные колонии (мукоидные и немучоидные варианты, варианты небольших колоний, с различным пигментом), а на устойчивость к антибиотикам следует исследовать несколько колоний.
2. Установлено, что с инфекцией, которая вызвана золотистым стафилококком и синегнойной палочкой можно успешно бороться с помощью антимикробной терапии и эти возбудители можно эрадикаровать. Также доказано, что после истинной эрадикации возможна повторная колонизация или тем же видом возбудителя,

но другого генотипа или другим видом возбудителя. По этим причинам после эрадикации необходимо проведение определенных противоэпидемических мероприятий, с целью недопущения повторной колонизации. В случае повторной колонизации необходимо проведение полноценного микробиологического исследования для выработки новой тактики лечения антимикробными препаратами.

3. *Vcc* и *Achromobacter* spp. невозможно эрадикаровать с помощью антимикробной терапии и в отношении данных возбудителей единственным эффективным методом может быть только вакцинация, для чего требуется разработка вакцины.
4. Определено, что инфекция, вызванная *Vcc* и *Achromobacter* spp. является типичной госпитальной инфекцией и средствами борьбы с ней должны быть изоляция больных с *Vcc* и *Achromobacter* spp. [8, 6, 13].
5. Инфекция, вызванная *P. aeruginosa* и *S. aureus*, может иметь различное происхождение и быть как госпитальной инфекцией, так и приобретаться вне госпиталя.

Литература

1. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2015 год. Москва: ИД «Медпрактика-М»; 2016: 72.
 2. Чернуха М. Ю., Аветисян Л. Р., Шагинян И. А. Алексеева Г. В., Авакян Л. В., Каширская Н. Ю. и др. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; 16 (4): 312–324.

3. Шагинян И. А., Капранов Н. И., Чернуха М. Ю., Каширская Н. Ю., Семькин С. Ю., Алексеева Г. В. и др. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. ЖМЭИ. 2010; 1: 15–20.
4. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций:клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005; 7 (3): 271–285.
5. Chernukha M., Avetisyan L., Alekseeva G., Avakian L., Kashirskaya N., Kapranov N. Phenotypic and genotypic characteristics of the epidemic clones of *Burkholderia cenocepacia* strains in patients with cystic fibrosis (CF) in Russian Federation J. of Cystic Fibrosis. Abstracts of the 38th European Cystic fibrosis conference Brussels, Belgium, 10–13 June 2015. 2015; 14 (Suppl. 1): 80.
6. Аветисян Л. Р., Шагинян И. А., Чернуха М. Ю. Основные механизмы формирования эпидемически значимых госпитальных клонов бактерий. Успехи современной биологии. 2016; 136 (1): 41–52.
7. Чернуха М. Ю., Аветисян Л. Р., Шагинян И. А., Алексеева Г. В., Авакян Л. В., Каширская Н. Ю. и др. Фенотипические и генотипические особенности штаммов бактерий *Burkholderia cepacia* complex, выделенных от больных муковисцидозом. Педиатрия, 2014; 93 (4): 24–31.
8. Амелина Е. Л., Ашерова И. К., Аветисян Л. Р., Баранова И. А., Волков И. К., Воронкова А. Ю. и др. Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» Москва; 2016: 204.
9. Воронина О. Л., Чернуха М. Ю., Шагинян И. А., Кунда М. С., Аветисян Л. Р., Орлова А. А. и др. Характеристика генотипов штаммов *Burkholderia cepacia* complex, выделенных от больных в стационарах Российской Федерации. Молекулярная генетика. Микробиология и Вирусология. 2013; 2: 22–30.
10. Дубоделов Д. В., Любасовская Л. А., Шубина Е. С., Мукосей И. С., Коростин Д. О., Кочеткова Т. О. др. Генетические детерминанты резистентности к β-лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. Генетика. 2016; 52 (9) 1097–1102.
11. Buermans H.P., den Dunnen J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochim. Biophys. Acta. 2014;1842 (10): 1932–1941.
12. Kushnareva M. V., Markhulia Kh. M., Demytyeva G. M., Keshishian E. S., Shaginyan I. A., Chernukha M. Yu. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* in preterm newborn infants. EC Pediatrics, 2017, 3 (4), 390–398.
13. Шагинян И. А., Чернуха М. Ю., Аветисян Л. Р. Основные механизмы изменчивости возбудителей хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Тезисы XIII Национального конгресс «Инновационные достижения в диагностике и терапии муковисцидоза» с международным участием, 17–28 апреля 2017 г. г. Сергиев Посад: 93–94.

References

1. National cystic fibrosis patients Registry of Russia. 2015. Moscow: Medpractica-M; 2016: 76 (in Russian).
2. Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A. et al. Microbiological Diagnosis Algorithm for Chronic Lung Infection in Patients with Cystic Fibrosis. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya. [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]. 2005; 7 (3): 271–285 (in Russian).
3. Shaginyan, I.A., Kapranov, N.I., Chernukha, M.Yu., Kashirskaya N. Yu., Semeykin S. Yu., Alekseeva G. V. et al. Microbial population of lower respiratory tract in children from different age groups with cystic fibrosis. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. [Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology]. (Moscow), 2010, No. 1, P. 15–20(in Russian).
4. Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu. Non-fermenting Gram-negative bacteria in the etiology of nosocomial infections: clinical, microbiological and epidemiological peculiarities. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya. [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]. 2005; 7 (3): 271–285(in Russian).
5. Chernukha M., Avetisyan L., Alekseeva G., Avakian L., Kashirskaya N., Kapranov N. Phenotypic and genotypic characteristics of the epidemic clones of *Burkholderia cenocepacia* strains in patients with cystic fibrosis (CF) in Russian Federation J. of Cystic Fibrosis. Abstracts of the 38th European Cystic fibrosis conference Brussels, Belgium, 10–13 June 2015. 2015; 14 (Suppl. 1): 80.
6. Avetisyan L. R., Shaginyan I. A., Chernukha M. Yu. The basic mechanisms of the formation of epidemically significant nosocomial bacterial clones. Uspehi sovremennoi biologii [Biology Bulletin Reviews]. 2016; 136 (1): 41–52 (in Russian).
7. Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A. Alekseeva G.V., Avakjan L.V., Kashirskaya N. Yu. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Burkholderia cepacia* complex strains, isolated from patients with cystic fibrosis. Pediatriya [Pediatrics]. 2014; 93 (4); 24–31.
8. Amelina E. L., Asherova I. K., Avetisyan L. R., Baranova I. A., Volkov I. K., Voronkova A. Yu. et al. The National Consensus «Cystic Fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy», Moscow; 2016: 204 (in Russian).
9. Voronina O. L., Chernukha M. Yu., Shaginyan I. A. Kunda M. S., Avetisyan L. R., Orlova A. A. et al. Characterization of genotypes for *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from patients in hospitals of the Russian federation. Mikrobiologiya i virusologiya. [Molecular Genetic, Microbiology, and Virology]. 2013; 2: 22–30 (in Russian).
10. Dubodelov D. V., Lubasovskaya L. A., Shubina E. S., Mukosey I. S., Korostin D. O., Kochetkova T. O. et al. Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to β-lactam antibiotics isolated in neonates. Genetika. [Russian Journal of Genetics]. 2016; 52 (9) 1097–1102 (in Russian).
11. Buermans H.P., den Dunnen J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochim. Biophys. Acta. 2014;1842 (10): 1932–1941.
12. Kushnareva M. V., Markhulia Kh. M., Demytyeva G. M., Keshishian E. S., Shaginyan I. A., Chernukha M. Yu. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* in preterm newborn infants. EC Pediatrics, 2017, 3 (4), 390–398.
13. Shaginyan I.A., Chernukha M.Yu., Avetisyan L.R. The basic mechanisms of the variability of pathogens of chronic lung infection in CF patients. XIII National Congress «Innovative achievements in diagnostic and therapy of cystic fibrosis» with international participation, 27–28 april 2017. Sergiev Posad: 93–94 (in Russian).