



О.В. КОНДРАТЕНКО, А.В. ЛЯМИН, А.В. ЖЕСТКОВ

УДК 616-056.7 (470.43)

Самарский государственный медицинский университет

Структура и антибиотикорезистентность микрофлоры, выделенной из нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом в г. Самаре

Кондратенко Ольга Владимировна

кандидат медицинских наук, ассистент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии

443086, г. Самара, ул. Революционная, д. 3, кв. 81, тел. 8-927-200-55-00; e-mail: helga1983@yandex.ru

Проведено микробиологическое обследование 37 проб мокроты, полученной от 34 пациентов с МВ. У 94,1% пациентов с муковисцидозом из нижних дыхательных путей выделены клинически значимые микроорганизмы, лидирующее место среди которых принадлежит неферментирующим грамотрицательным бактериям. Большинство из них характеризуются выраженной антибиотикорезистентностью.

Ключевые слова: муковисцидоз, микрофлора, антибиотикорезистентность.

O.V. KONDRATENKO, A.V. LYAMIN, A.V. ZHESTKOV

Samara State Medical University

Structure and antibiotic resistance microflora isolated from lower respiratory tract in patients with cystic fibrosis in Samara

The microbiological examination of 37 sputum specimens obtained from 34 patients with CF was carried out. In 94.1% of patients with cystic fibrosis of the lower respiratory tract identified clinically relevant microorganisms, leading place among them belongs to the non-fermenting gram-negative bacteria. Most of them characterized by a pronounced antibiotic resistance.

Keywords: cystic fibrosis, microflora, antibiotic resistance.

Пациенты с муковисцидозом (МВ) являются источниками хронической бактериальной инфекции, возбудители которой многочисленны и разнообразны. Прогноз этой группы больных в первую очередь зависит от тяжести поражения органов дыхания. В патогенезе данных изменений ведущая роль принадлежит *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. У пациентов в возрасте до 9 лет из мокроты также могут выделяться *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*. Реже могут встречаться представители семейства *Enterobacteriaceae* [1, 2]. У пациентов старших возрастных групп инфекционный процесс может быть обусловлен *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, грибами рода *Candida* и *Aspergillus* [3, 4]. *S. aureus* часто выступает как первый микроорганизм, выделяемый из мокроты или кашлевого мазка новорожденных с МВ, не получавших длительной антистафилококковой терапии [5]. *P. aeruginosa*

является наиболее часто описываемым оппортунистическим патогеном у пациентов с МВ: она чаще других выделяется из мокроты или бронхоальвеолярного лаважа больных МВ всех возрастных групп [6-9].

В последнее время в патологии бронхолегочной системы у пациентов с МВ стала возрастать роль неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ). Следует отметить тот факт, что представители НФГОБ характеризуются выраженной антибиотикорезистентностью, что создает огромные проблемы для терапии. При этом устойчивость может быть как природной, связанной с мутациями в хромосоме, так и приобретенной, чаще плазмидопосредованной.

Еще одной особенностью представителей НФГОБ является сложность их видовой идентификации. Несмотря на то, что существует несколько алгоритмов определения этих микро-

организмов, основанных на их биохимической активности, большинство из них не являются высокочувствительными и специфичными. Между тем определение вида микроорганизма является залогом грамотной и эффективной антибактериальной терапии.

Среди НФГОБ важную роль в развитии легочной инфекции у многих пациентов с МВ играет *Acinetobacter spp.* Данный микроорганизм в силу своих структурных особенностей не способен вызвать инфекционный процесс у здоровых людей, но у пациентов с МВ он является вторым представителем НФГОБ по частоте после *P. aeruginosa*. При этом *Acinetobacter spp.* обладает выраженной способностью к формированию антибиотикорезистентности, реализуемой за счет комплекса механизмов. Помимо продукции β -лактамаз устойчивость у штаммов *Acinetobacter spp.* может реализовываться за счет изменения проницаемости наружной мембраны и изменения структуры пенициллин-связывающих белков. При этом все перечисленные механизмы могут быть реализованы одновременно [10-12].

Несколько реже встречается *Burkholderia cepacia*. Комплекс *B. cepacia* представляет собой группу минимум из девяти тесно связанных друг с другом бактериальных видов [13, 14], которые выделяются в качестве патогенов при МВ в течение последних двадцати лет. Данные многих исследований подтверждают высокий уровень контагиозности и вирулентности *B. cepacia*, геномвар III (теперь обозначается как *B. cenocepacia*) у пациентов с МВ [15]. При этом выявление *B. cepacia* в популяции пациентов с МВ возросло и в настоящее время составляет 6-7%, а в некоторых специализированных центрах достигает 20-30% [16]. Выявление *B. cepacia* у пациентов с МВ расценивается рядом исследователей как прогностически неблагоприятный факт. Отдельную проблему представляет резистентность *B. cepacia* к некоторым классам антибактериальных препаратов в частности к карбапенемам и аминогликозидам.

S. maltophilia выделяется в мокроте пациентов с МВ приблизительно с той же частотой, что и *B. cepacia*. Однако опубликованные на сегодня исследования не позволяют вынести окончательного заключения о том, связано ли выявление этой инфекции с повышением уровня болезненности и смертности [17-21]. Особую проблему составляет терапия инфекции, ассоциированной со *S. maltophilia*. Данный микроорганизм обладает выраженной природной резистентностью ко многим классам антимикробных препаратов, за счет наличия у нее β -лактамаз L-1 и L-2.

Таким образом, разнообразие микроорганизмов, выделяемых из мокроты у пациентов с МВ, и особенно группа НФГОБ, представляют серьезную проблему для терапии бронхолегочной инфекции при МВ.

Материалы и методы

Проведено микробиологическое обследование 37 проб мокроты, полученных от 34 пациентов с МВ. При этом 1 (2,9 $\pm$ 2,8%) ребенок обследован троекратно. Исследуемый материал собирался у пациентов в утренние часы, доставлялся в лабораторию в течение 2-3 часов после сбора. Посев проводился на элективные и дифференциально-диагностические среды. Оценивали количество и морфологию выросших колоний, проводили видовую идентификацию с помощью биохимических тестов, оценивали гемолитическую активность, определяли чувствительность выделенных штаммов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом. Для выделенных неферментирующих грамотрицательных бактерий определяли способность к продукции металло- β -лактамаз методом двойных дисков с ЭДТА, при этом учитывалась природная способность *S. maltophilia* к выработке данного фермента.

В результате микробиологического исследования мокроты был выделен 81 штамм микроорганизмов. У всех 34 обследованных пациентов с МВ (100%) выделялись микроорганизмы из нижних дыхательных путей (НДП). При этом среди выделенных микроорганизмов 28 штаммов (34,6 $\pm$ 5,3%) были клинически незначимыми и явились следствием контаминации мокроты жидкостью ротовой полости. Клинически значимые микроорганизмы (52 штамма) выделялись у 32 пациентов (94,1 $\pm$ 4,0%).

Обсуждение полученных результатов

В структуре клинически значимой выделенной микрофлоры доминирующее положение занимали неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы (НФГОБ), среди которых лидирующее место принадлежало *P. aeruginosa*. Структура и количественная характеристика клинически значимых микроорганизмов, выделенных из НДП пациентов с МВ, представлены в таблице 1.

В результате проведенного исследования в большинстве случаев, в 20 образцах (58,8 $\pm$ 8,4%), выделялись монокультуры и только в 14 образцах (41,2 $\pm$ 8,4%) — ассоциации микроорганизмов. При этом наиболее распространенными сочетаниями были комбинации НФГОБ с *S. aureus* и/или *Candida spp.* Среди монокультур, выделенных от пациентов с МВ, большинство составили НФГОБ, из них в 8 (40,0 $\pm$ 10,9%) случаях *P. aeruginosa*, в 2 (10,0 $\pm$ 6,7%) — *Acinetobacter spp.* и у 1 (5,0 $\pm$ 4,9%) — *S. maltophilia*. В 3 случаях были выделены *S. aureus* — (15,0 $\pm$ 7,9%), у 5 пациентов (25,0 $\pm$ 9,6%) — *Streptococcus spp.*, а в 1 случае (5,0 $\pm$ 4,9%) — грибы рода *Chladophialophora*.

Доминирующую роль в структуре выделенных штаммов занимали представители НФГОБ. Было выделено 27 штаммов от 20 пациентов с МВ из 34 обследованных. При этом у 8 (40,0 $\pm$ 10,9%) пациентов это было первое в жизни выделение НФГОБ. Из них у 7 (87,5 $\pm$ 11,7%) было первое выявление *P. aeruginosa* и у одного больного (12,5 $\pm$ 11,7%) — *B. cepacia*. Более чем у трети пациентов за период обследования отмечался дебют синегнойной инфекции.

В структуре выделенных штаммов лидирующее место занимала *P. aeruginosa* (14 штаммов (51,9 $\pm$ 9,6%)). Из них 10 штаммов (71,4 $\pm$ 12,0%) были в немуконидной и 4 (28,6 $\pm$ 12,0%) — в мукоидной форме. В 8 случаях *P. aeruginosa* выделялась в монокультуре (при этом во втором случае в мукоидной форме), в остальных случаях — в ассоциации с другими микроорганизмами.

На втором месте по частоте выделения среди всех НФГОБ были представители рода *Acinetobacter* (4 штамма (14,8 $\pm$ 6,8%)). При этом в 2 случаях (50,0 $\pm$ 9,6%) *Acinetobacter spp.* выделялся в виде монокультуры; в 1 случае (25,0 $\pm$ 8,3%) — в комбинации с грибами рода *Candida* и в 1 случае (25,0 $\pm$ 8,3%) — в сочетании с *S. pyogenes*.

На третьем месте по частоте была *S. maltophilia* (3 штамма (11,1 $\pm$ 6,0%)). В 2 случаях возбудитель выделялся в комбинации с другими микроорганизмами. Из них у 1 ребенка (33,3 $\pm$ 9,1%) в комбинации с *S. aureus* и в 1 случае (33,3 $\pm$ 9,1%) в комбинации с 2 штаммами *P. aeruginosa*. В 1 (33,3 $\pm$ 9,1%) случае микроорганизм был в монокультуре.

В равной степени часто встречались *B. cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas diminuta* по 2 штамма (7,4 $\pm$ 5,0%), соответственно. Структура выделенных штаммов НФГОБ представлена на рисунке 1.

Штаммы *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* выделялись преимущественно у пациентов со смешанной формой и тяжелым течением заболевания. Штаммы *S. maltophilia*, *B. cepacia*, *P. alcaligenes* и *P. diminuta* встречались преимущественно у пациентов со среднетяжелым, реже — с тяжелым вариантом

Таблица 1.
Структура клинически значимых микроорганизмов, выделенных из НДП пациентов с МВ

Микроорганизм	Пациенты с МВ	
	Количество штаммов (n=53)	M±m,%
<i>P.aeruginosa</i> , немуконидная форма	10	18,9±5,4%
<i>P.aeruginosa</i> , муконидная форма	4	7,5±3,6%
<i>Acinetobacter</i> spp.	4	7,5±3,6%
<i>B.cepacia</i>	2	3,7±2,6%
<i>S.maltophilia</i>	3	5,6±3,2%
<i>P.diminuta</i>	2	3,7±2,6%
<i>P.alcaligenes</i>	2	3,7±2,6%
<i>S.aureus</i>	7	13,2±4,6%
<i>S.pyogenes</i>	4	7,5±3,6%
<i>S.pneumoniae</i>	6	11,3±4,3%
<i>E.coli</i>	2	3,7±2,6%
<i>Candida albicans</i>	6	11,3±4,3%
<i>Cladophialaphora</i> spp.	1	1,9±1,8%

Таблица 2.
Резистентность к антибиотикам штаммов НФГОБ, выделенных от пациентов с МВ

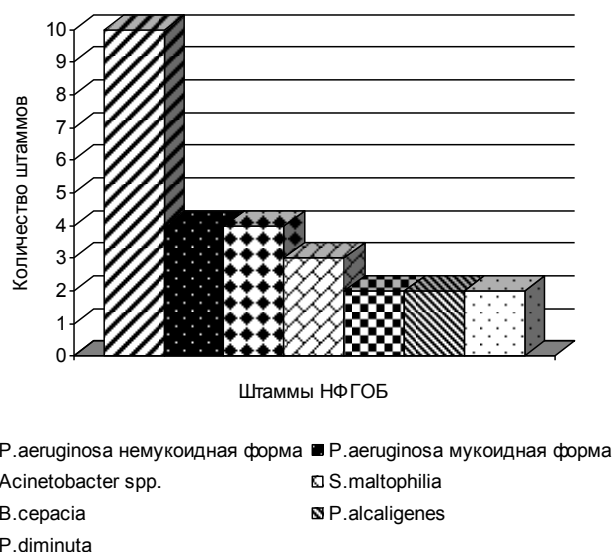
Тестируемый антибиотик	НФГОБ (n=27)	
	N	M±m,%
Цефтазидим	10	37,0±9,3%
Цефепим	4	14,8±6,8%
Ципрофлоксацин	12	44,4±9,5%
Имипенем	6	22,2±7,9%
Меропенем	5	18,5±7,4%
Гентамицин	14	51,8±9,6%
Амикацин	15	55,5±9,5%

течения МВ. У пациентов с легким течением заболевания не было случаев выделения НФГОБ.

Нами была проведена оценка чувствительности выделенных штаммов к антимикробным химиопрепаратам. Так, у 2 (28,6±17,0%) из 7 выделенных штаммов *S.aureus*, выделенных от пациентов с МВ, была выявлена резистентность к пенициллину. Среди выделенных штаммов стафилококков не было выявлено штаммов метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA). 2 штамма (28,6±17,0%) *S.aureus* были резистентны к эритромицину при сохранении чувствительности к клиндамицину. Штаммы, имеющие такой вариант резистентности, обозначаемый как М-фенотип, характеризуются устойчивостью к 14-, 15-членным макролидам при сохранении чувствительности к 16-членным. 1 штамм (14,3±13,2%) был резистентен к гентамицину.

Все штаммы стрептококков (*S.pyogenes*, *S.pneumoniae*) были чувствительны ко всем тестируемым препаратам. Оба штамма *E.coli* (100,0±0%), выделенные от пациентов с МВ, были чувствительны ко всем тестируемым препаратам.

Рисунок 1.
Структура НФГОБ у пациентов с МВ



Учитывая способность НФГОБ продуцировать различные факторы устойчивости к антимикробным химиопрепаратам, нами уделялось особое внимание оценке антибиотикорезистентности выделенных штаммов этой группы бактерий. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что большинство протестированных штаммов резистентны к аминогликозидам, многие штаммы резистентны к фторхинолонам и цефалоспорином I-III поколения.

Из всех штаммов НФГОБ только 4 (14,8±6,8%) штамма *P.aeruginosa* были чувствительны ко всем тестируемым антибиотикам. 23 (85,2±6,8%) штамма НФГОБ были резистентны к одному и более антибиотикам. 2 штамма (7,4±5,0%) НФГОБ имели изолированную резистентность к меропенему, 3 штамма (11,1±6,0%) — имели изолированную резистентность к имипенему. У 6 (22,2±7,9%) штаммов НФГОБ фенотип резистентности указывал на продукцию хромосомных β-лактамаз класса C — AmpC.

При оценке антибиотикорезистентности *P.aeruginosa* было выявлено, что наибольшая устойчивость отмечается к фторхинолонам и аминогликозидам, а наиболее эффективным антибиотиком является цефепим. Все штаммы *Acinetobacter* spp. были чувствительны к карбапенемам, отмечался высокий уровень устойчивости к цефалоспорином III-IV поколения и фторхинолонам, как и среди штаммов *S.maltophilia*.

Таким образом, большинство штаммов НФГОБ, выделенных от пациентов с МВ, характеризуются выраженной антибиотикорезистентностью, что, безусловно, создает трудности для терапии хронической бронхолегочной инфекции.

У 27 выделенных штаммов НФГОБ проводилось определение продукции металло-β-лактамаз (MBL) методом двойных дисков с ЭДТА. Выявление штаммов с MBL-фенотипом существенно затрудняет проведение антимикробной химиотерапии. Нами не было выделено ни одного штамма, продуцирующего MBL, что оценивается как благоприятный аспект для терапии и дальнейшего прогноза пациентов.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. У 94,1% пациентов с муковисцидозом из нижних дыхательных путей выделяются клинически значимые микроорганизмы,

лидирующее место среди которых принадлежит неферментирующим грамотрицательным бактериям.

2. Большинство штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов с муковисцидозом в Самаре, характеризуется выраженной антибиотикорезистентностью, как генетически опосредованной, так и приобретенной. При этом 85,2% штаммов имели резистентность к 1 и более антибактериальным препаратам.

3. Среди выделенных штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий отмечался высокий уровень устойчивости к фторхинолонам ($44,4 \pm 9,5\%$), цефалоспорином III ($37,0 \pm 9,3\%$) и IV ($14,8 \pm 6,8\%$) поколения и аминогликозидам (гентамицин — $51,8 \pm 9,6\%$; амикацин — $55,5 \pm 9,5\%$).

4. Не было выделено штаммов метициллинрезистентного золотистого стафилококка и MBL-продуцирующих штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Светлова З.В. Функция почек при муковисцидозе / Нефрология, 1999. — Т. 3. — № 3. — С. 28-31.
2. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.S. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary / Science, 1989. — Vol. 245. — P. 1066-1073.
3. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Актуальные проблемы муковисцидоза / Педиатрия, 1998. — № 1. — С. 61-66.
4. Капранов Н.Н. Муковисцидоз — современное состояние проблемы / Пульмонология. Приложение по муковисцидозу, 2006. — С. 5-11.
5. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2001 Annual Data Report, Bethesda, MD, USA. Cystic Fibrosis Foundation 2002.
6. Anonymous. Cystic fibrosis foundation patient registry 1997 annual data report. Bethesda, MD, USA. Cystic Fibrosis Foundation 1998.
7. Botzenhart K., Doring G. Epidemiology and ecology of *Pseudomonas aeruginosa*. In M. Campa, M. Bendinelli, H. Friedman, eds. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen / New York, Plenum Press, 1993. — P. 1-18.
8. Hoiby N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients / Acta Paediatr Scand Suppl., 1982. — 301. — P. 33-54.
9. Stern M., Doring G. Qualitätssicherung Mukoviszidose / Zentrum für Qualitätsmanagement im Gesundheitswesen. Ärztekammer Niedersachsen, Post-fach 4749, 30047 Hanover, 1997.
10. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: МАКМАХ, 2002. — 382 с.
11. Практическое руководство по антимикробной химиотерапии / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — Смоленск: МАКМАХ, 2007. — 464 с.
12. Страчунский Л.С., Козлов С.Н., Дехнич А.В. Клиническая фармакология антибиотиков. — Смоленск: СГМА, 2004. — 128 с.
13. Coenye T., Vandamme P., Govan J.R.W., LiPuma J.J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex / J Clin Microbiol., 2001. — 39. — P. 3427-36.
14. Vandamme P., Henry D., Coenye T., Nzula S. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools / FEMS Immunol Med Microbiol., 2002. — 33. — P. 143-9.
15. Vandamme P., Holmes B., Conye T., Goris J. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. — a new twist to an old story / Res Microbiol., 2003. — 154. — P. 91-6.
16. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2005. — Т. 3, № 7. — С. 271-285.
17. Demko C.A., Stern R.C., Doershuk C.F. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence / Pediatr Pulmonol., 1998. — 25. — P. 304-8.
18. Di San'Agnesse P.A., Andersen D.H. Celiac syndrome: chemotherapy in infection of the respiratory tract associated with cystic fibrosis of the pancreas; observation with penicillin and drugs of the sulphoneamide groups, with special reference to penicillin aerosol / Am J Dis Child., 1946. — 72. — P. 17-61.
19. Gladman G., Connor P.J., Williams R.F., David T.J. Controlled study of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis / Arch Dis Child., 1992. — 67. — P. 192-5.
20. Goss C.H., Aitken M.L., Otto K., Rubenfeld G.D. Acquiring *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival in patients with cystic fibrosis / Am J Respir Crit Care Med., 2002. — 166. — P. 356-61.
21. Karpati F., Malmberg A.S., Alfredsson H., Hjelte L., Strandvik B. Bacterial colonization with *Xantomonas maltophilia* — a retrospective study in a cystic fibrosis patients population / Infection., 1994. — 22. — P. 258-63.

НОВОЕ В МЕДИЦИНЕ. ИНТЕРЕСНЫЕ ФАКТЫ

К 2012 ГОДУ НОВОСИБИРСКИЕ УЧЕНЫЕ ОБЕЩАЮТ ЗАВЕРШИТЬ ПЕРВЫЙ ЭТАП КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ УНИКАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ

К 2012 году новосибирские ученые из государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» обещают завершить первый этап клинических испытаний вакцины против ВИЧ, сообщает «Интерфакс».

Гендиректор «Вектора» Александр Сергеев констатирует: «По окончании первой фазы испытаний мы передадим отчет в Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Трудно предположить, как там оценят проделанную работу».

В настоящей вакцине упор сделан на гуморальный (противоинфекционная защита, осуществляемая посредством различных белков, растворимых в крови и жидкостях организма) и клеточный иммунитет. А вот разработки предыдущего поколения опирались только на один тип иммунитета. Российские же специалисты взяли ДНК вируса, «навешали» на нее другие ДНК.

Скорее всего, новая вакцина может быть внедрена после прохождения трех фаз клинических испытаний. Кстати, летом 2012 года «Вектор» начнет тестирование вакцины против пандемического гриппа H1N1. «Мы получили штамм методом обратной генетики, который ляжет в основу вакцины, дающей достаточно хороший эффект. Вероятно, вторая фаза клинических исследований начнется летом 2012 года. Отчет по первой фазе мы уже передали экспертам», — рассказывает Сергеев.

Источник <http://www.medlinks.ru>