

УДК 616.37-003.4:616.2-022.14]:579(476)

DOI: 10.14427/jipai.2018.1.56

Микробиологическая характеристика возбудителей респираторных инфекций, выявленных у пациентов с муковисцидозом на территории Республики Беларусь

В.А. Горбунов¹, В.В. Пугач¹, Ю.А. Шишпорёнок¹, А.А. Аноп¹, В.И. Бобровничай²¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Microbiological characteristics of respiratory pathogens, found in patients with cystic fibrosis in the Republic of Belarus

V.A. Gorbunov¹, V.V. Pugach¹, J.A. Shishporonok¹, A.A. Anop¹, V.I. Bobrovnichiy²¹ Republican Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Аннотация

Цель исследования – изучить этиологическую структуру и антибиотикорезистентность возбудителей респираторных инфекций у пациентов с муковисцидозом в Республике Беларусь. Исследованы 64 пробы отделяемого респираторного тракта, проведена видовая идентификация выделенных микроорганизмов, определена их чувствительность к антибиотикам. Результаты исследования показали, что *P. aeruginosa* обнаруживалась в 42,6% исследованных образцов, *S. aureus* – в 39,3%, дрожжеподобные грибы рода *Candida* – в 32,8%. Многие штаммы микроорганизмов характеризовались высокими уровнями устойчивости к антибиотикам. Таким образом, выбор средств для этиотропной терапии респираторных инфекций у пациентов с муковисцидозом должен осуществляться с учётом вида возбудителя и профиля его резистентности к антимикробным средствам.

Ключевые слова

Муковисцидоз, возбудители респираторных инфекций, антибиотикорезистентность.

Введение

Муковисцидоз является генетически обусловленной патологией с аутосомно-рецессивным типом наследования. Прогноз при этой болезни, определяется, прежде всего, степенью тяжести поражения органов дыхания, в патогенезе которых

Summary

Aim of the research – to determine etiological structure and resistance to antibiotics of the causative agents of respiratory infections in patients with cystic fibrosis in Republic of Belarus. Identification and determination of antibiotic resistance of microorganisms, found in 64 samples of respiratory tract secretions, was held out. Results of the research show, that *P. aeruginosa* was found in 42,6% of samples tested, *S. aureus* – in 39,3%, yeast-like fungi *Candida spp.* – in 32,8%. Many of the strains of microorganisms were highly resistant to antimicrobials. Therefore, choice of drugs for etiotropic therapy of respiratory infections in patients with cystic fibrosis should be carried out concerning species of a causative agent and its antibiotic resistance profile.

Keywords

Cystic fibrosis, causative agents of respiratory infections, antibiotic resistance.

важную роль играют инфекционные осложнения. В качестве возбудителей в мировой научной литературе чаще всего указываются *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, а также представители семейства Enterobacteriaceae. Имеются

определённые отличия в этиологической структуре инфекций у пациентов с муковисцидозом в зависимости от возраста: так, у лиц старше 20 лет в качестве этиологического агента инфекционного процесса могут выступать *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, грибы родов *Candida* и *Aspergillus*. Однако во всех возрастных группах пациентов с муковисцидозом лидируют *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Наиболее неблагоприятно протекает инфекция, обусловленная мукоидными штаммами *P. aeruginosa*, продуцирующими альгинат – экзополисахарид – фактор вирулентности данных бактерий. Микроколонии *P. aeruginosa*, покрытые альгинатом, труднее доступны действию антибиотиков. Это значительно затрудняет лечение и ухудшает прогноз заболевания [1, 2, 3]. Штаммы золотистого стафилококка, выделяемые от пациентов с муковисцидозом, в отличие от изолятов при другой лёгочной патологии или у здоровых лиц, проявляют выраженный тропизм к эпителию воздухоносных путей. С помощью адгезинов своей оболочки, стафилококки прочно прикрепляются к эпителиальным клеткам.

Цель исследования – изучение этиологической структуры возбудителей респираторных инфекций у пациентов с муковисцидозом в Республике Беларусь, а также определение антибиотикорезистентности выделенных штаммов бактерий и грибов для обоснования выбора тактики рациональной антимикробной терапии.

Материалы и методы

Было проведено однократное микробиологическое исследование 64 образцов биологического материала (отделяемое респираторного тракта), полученных от 64 пациентов с муковисцидозом. Материал отбирался в соответствии с правилами взятия материала в транспортную среду Амиеса.

Микробиологическое исследование проводилось не позднее 48 ч от момента забора путём посева материала на чашки Петри с 5%-ным кровяным, желточно-солевым, дезоксихолатным агаром или средой Эндо и агаром Сабуро. Режим инкубации посевов выбирался в зависимости от определяемой микрофлоры: при 37 °С в течение 24–48 часов для выявления бактериальной микрофлоры, при 30 °С в течение 42–78 ч – 10 сут для выявления грибковой микрофлоры.

Идентификация выделенных культур микроорганизмов проводилась на основании результатов изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств. Одновременно с постановкой вышеперечисленных тестов, для

повышения достоверности результатов видовой идентификации использовался автоматический микробиологический анализатор Vitek 2 Compact («BioMerieux», Франция).

Чувствительность бактерий и грибов к антибиотикам определялась диском-диффузионным методом (диски с антибиотиками производства ЦНИИФ, Санкт-Петербург, РФ) на агаре Мюллера–Хинтона и при помощи автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact («BioMerieux», Франция). Интерпретация результатов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам осуществлялась в соответствии с рекомендациями EUCAST [4].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартных статистических программ (Statistica 6.0 (StatSoft Inc.), Microsoft Excel 2007).

Результаты

В исследовании принимали участие пациенты в возрасте от 1 до 18 лет ($n=61$, 25–75 процентиля 5–12 лет), при этом медиана возраста составила 8 лет, мода – 6 лет. Данные о возрасте 3 (4,7%) из 64 пациентов отсутствовали. Доля лиц женского пола среди обследованных составила 51,5%, мужского пола – 46,9%. Данные о половой принадлежности 1,6% пациентов предоставлено не было.

Пациенты являлись жителями г. Минска, а также городской и сельской местности Минской, Витебской и Гомельской областей. В структуре обследованных пациентов превалировало городское население (более 79%), в то время как на долю сельского населения приходилось около 19% пациентов.

Для дальнейшего анализа пациенты были разделены на три возрастные группы: 0–5 лет, 6–10 лет и 11 лет и старше. Возрастные интервалы подобраны именно таким образом, поскольку известно, что колонизация лёгких микроорганизмами пациентов с муковисцидозом начинается фактически с первых дней постнатального периода и достигает максимума уже к 5 годам жизни.

В результате анализа возрастной структуры пациентов было установлено, что 27,87% обследованных пациентов относились к возрастной группе 0–5 лет, 40,98% – к группе 6–10 лет, а 31,15% – к группе 11 лет и старше. Таким образом, можно заключить, что у 72,13% обследованных пациентов имеется сформированный микробиоценоз респираторного тракта, а, следовательно, он более стабилен, и вероятность выделения резистентных к широкому спектру антибиотиков

штаммов микроорганизмов от этих пациентов достаточно высока. В то же время микробиоценоз респираторного тракта 27,87% обследованных ещё находится в стадии формирования, что обуславливает необходимость более тщательного подхода к интерпретации полученных данных микробиологического обследования пациентов из данной группы с целью выявления резидентных штаммов и дифференциации их с транзитной микрофлорой.

В результате проведённого исследования было выделено 93 штамма разных видов бактерий и грибов. Наиболее часто в исследованных образцах биоматериала обнаруживались микроорганизмы вида *P. aeruginosa* (обнаружены в 42,6% исследованных образцов), *S. aureus* (обнаружены в 39,3% исследованных образцов) и дрожжеподобные грибы рода *Candida* (обнаружены в 32,8% исследованных образцов). Частота обнаружения других видов микроорганизмов была существенно меньше. Среди минорных видов были обнаружены коагулазонегативные стафилококки (13,1%), *Klebsiella pneumoniae* (4,9%), *Enterococcus faecalis* и *Kocuria kristinae* (по 1,6%). При этом, роста бактерий и грибов в биоматериале 14,8% обследованных лиц не выявлено (табл. 1).

Определённый интерес представляет частота обнаружения микробных ассоциаций в респираторном тракте пациентов с муковисцидозом и их видовой состав. Так, было установлено, что у 37,8% обследованных микроорганизмы обнаруживались в монокультуре. Микробные ассоциации были выявлены в образцах биоматериала 47,7% обследованных, причём ассоциации из двух видов микроорганизмов были обнаружены в биоматериале 34,5% обследованных, а состоящие из трёх видов микроорганизмов – в

биоматериале 13,2% обследованных. Среди двухкомпонентных микробных ассоциаций чаще всего обнаруживалась ассоциация стафилококков и дрожжеподобных грибов *Candida*, которые наблюдались в 16,4% от общего количества исследованных образцов, а среди трёхкомпонентных ассоциаций – ассоциация стафилококков, синегнойной палочки и дрожжеподобных грибов рода *Candida* (6,6% от общего количества исследованных образцов).

Следующей задачей нашего исследования было определение уровней чувствительности выявленных микроорганизмов к антимикробным средствам. Для дальнейшего анализа полученной информации антибиотики были разделены на 5 групп: антибиотики с очень низкой (устойчивы 81–100% исследованных штаммов), низкой (устойчивы 61–80% исследованных штаммов), умеренной (устойчивы 41–60% исследованных штаммов), высокой (устойчивы 21–40% исследованных штаммов) и очень высокой (устойчивы 0–20% исследованных штаммов) эффективностью *in vitro* в отношении выделенных штаммов микроорганизмов.

При анализе полученной информации было установлено, что все выделенные штаммы золотистого стафилококка оказались устойчивыми к бензилпенициллину. При этом, изучение чувствительности к антибиотикам штаммов *S. aureus* выявило высокий удельный вес (80,0% выделенных штаммов *S. aureus*) метициллинорезистентных стафилококков (MRSA). Помимо этого, выделенные штаммы стафилококков продемонстрировали высокую устойчивость к эритромицину, клиндамицину, гентамицину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину. Умеренной эффективностью *in vitro* в отношении обнару-

Таблица 1. Частота выделения микроорганизмов из респираторного тракта пациентов с муковисцидозом

| Микроорганизмы | Частота выделения, % | | | |
|-------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|
| | 0–5 лет (n=17) | 6–10 лет (n=25) | 11 лет и старше (n=19) | Всего (n=61) |
| Нет роста микроорганизмов | 11,8 | 4,0 | 31,6 ^{2,3} | 14,8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 58,8 | 28,0 | 36,8 | 39,3 |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | 11,8 | 16,0 | 10,5 | 13,1 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 52,9 | 44,0 | 31,6 | 42,6 |
| <i>Candida spp.</i> | 52,9 | 16,0 ¹ | 36,8 | 32,8 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5,9 | 0 | 10,5 | 4,9 |
| <i>Kocuria kristinae</i> | 0 | 4,0 | 0 | 1,6 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 5,9 | 0 | 0 | 1,6 |

Примечания: ¹ различия в группах «0–5 лет» и «6–10 лет» достоверны; ² различия в группах «0–5 лет» и «11 лет и старше» достоверны; ³ различия в группах «6–10 лет» и «11 лет и старше» достоверны, ($p \leq 0,05$).

женных штаммов стафилококков характеризовались ко-тримоксазол, линезолид и ванкомицин. Высокой и очень высокой эффективностью *in vitro* в отношении выделенных штаммов стафилококков обладали хинупристин/дальфопристин и тигециклин, однако, эти антибиотики в настоящее время практически не применяются на территории Республики Беларусь. Следует отметить, что анализ удельного веса устойчивых штаммов стафилококков в разных возрастных группах пациентов не выявил достоверных различий. Только в группе детей 6–10 лет достоверно чаще выделялись штаммы стафилококков чувствительные к ко-тримоксазолу и устойчивые к тигециклину (табл. 2).

В результате исследования уровней чувствительности к антибиотикам *P. aeruginosa* ($n=26$) было установлено, что все они характеризовались очень высокими уровнями устойчивости к пенициллинам (в том числе, защищенным) и цефалоспорином с антисинегнойной активностью: тикарциллину, тикарциллину/клавуланату, пиперациллину, пиперациллину/тазобактаму, цефтазидиму и цефепиму. Умеренную устойчивость штаммы синегнойной палочки проявляли в отношении колистина, тобрамицина, амикацина, имипенема. Антибиотиками с наибольшей эффективностью *in vitro* в отношении исследованных штаммов *P. aeruginosa* оказались меропенем и левофлоксацин. В отношении большинства антибиотиков не установлены достоверные различия

по частоте выделения устойчивых штаммов *P. aeruginosa* в зависимости от возраста пациента. В группе пациентов с муковисцидозом 6–10 лет синегнойная палочка была достоверно менее устойчива к тикарциллину и такрциллину/клавуланату. В группе же 11 лет и старше *P. aeruginosa* достоверно чаще была устойчива к имипенему, гентамицину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, что может быть связано с длительным применением этих антибиотиков в данных группах пациентов и формированием приобретённой устойчивости (табл. 3).

Анализ возрастной структуры пациентов, от которых были выделены дрожжеподобные грибы рода *Candida*, показал, что большая часть пациентов (44%) принадлежала к группе 6–10 лет, наименьшая (16%) – к группе 0–5 лет. Доля пациентов в возрасте 11 лет и старше составила 32%. Было установлено, что доля лиц, проживающих в городской местности, составила 72%. Чувствительность выделенных штаммов грибов исследовалась в отношении 6 антимикотиков: кетоконазола, итраконазола, амфотерицина В, нистатина, флуконазола и клотримазола. Результаты исследования показали, что антимикотиком с наибольшей эффективностью *in vitro* в отношении выделенных штаммов дрожжеподобных грибов рода *Candida* являлся амфотерицин В, доля устойчивых штаммов к которому составила 22,73%. Наименее эффективными *in vitro* оказались кетоконазол, итраконазол и флуконазол,

Таблица 2. Резистентность к антибиотикам штаммов стафилококков, выделенных у детей с муковисцидозом разных возрастных групп

| Антибиотик | Удельный вес (%) устойчивых штаммов стафилококков выделенных у детей возрастных групп: | | | Всего ($n=30$) |
|----------------------------|--|---------------------|---------------------------|------------------|
| | 0–5 лет ($n=9$) | 6–10 лет ($n=12$) | 11 лет и старше ($n=9$) | |
| Бензилпенициллин | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Оксациллин | 77,8 | 83,3 | 77,8 | 80,0 |
| Эритромицин | 66,7 | 83,3 | 77,8 | 76,7 |
| Клиндамицин | 55,6 | 75,0 | 55,6 | 63,3 |
| Гентамицин | 66,7 | 75,0 | 66,7 | 70,0 |
| Ванкомицин | 33,3 | 58,3 | 44,4 | 46,7 |
| Ципрофлоксацин | 66,7 | 83,3 | 77,8 | 76,7 |
| Левофлоксацин | 55,6 | 75,0 | 66,7 | 66,7 |
| Моксифлоксацин | 55,6 | 91,7 | 77,8 | 76,7 |
| Линезолид | 33,3 | 75,0 | 66,7 | 60,0 |
| Ко-тримоксазол | 88,9 | 16,7* | 33,3 | 43,3 |
| Хинупристин/ дальфопристин | 0 | 16,7 | 11,1 | 10,0 |
| Тигециклин | 0 | 41,7* | 22,2 | 23,3 |

Примечание. * – различия с предыдущей группой достоверны ($p \leq 0,05$).

Таблица 3. Резистентность к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у детей с муковисцидозом разных возрастных групп

| Антибиотик | Удельный вес (%) устойчивых штаммов <i>P. aeruginosa</i> ? выделенных у детей возрастных групп: | | | Всего (n=26) |
|-----------------------------|--|-------------------|--------------------------|-----------------|
| | 0–5 лет (n=11) | 6–10 лет (n=9) | 11 лет и старше (n=6) | |
| Тикарциллин | 81,8 | 77,8 ¹ | 100,0 | 84,6 |
| Тикарциллин/ Клавуланат | 81,8 | 77,8 ¹ | 100,0 | 84,6 |
| Пиперациллин | 100,0 | 77,8 | 100,0 | 92,3 |
| Пиперациллин/ Тазобактам | 100,0 | 66,7 | 100,0 | 88,5 |
| Цефтазидим | 90,9 | 77,8 | 100,0 | 88,5 |
| Цефепим | 81,8 | 66,7 | 100,0 | 80,8 |
| Имипенем | 18,2 | 33,3 | 100,0 ^{2,3} | 42,3 |
| Меропенем | 0 | 0 | 33,3 | 7,7 |
| Амикацин | 36,4 | 66,7 | 83,3 | 57,7 |
| Гентамицин | 45,5 | 55,6 | 100,0 ^{2,3} | 61,5 |
| Тобрамицин | 45,5 | 44,4 | 66,7 | 50,0 |
| Ципрофлоксацин | 18,2 | 11,1 | 66,7 ³ | 26,9 |
| Левифлоксацин | 9,1 | 0 | 66,7 ^{2,3} | 19,2 |
| Колистин | 45,5 | 66,7 | 16,7 | 46,2 |

Примечания: ¹ различия в группах «0–5 лет» и «6–10 лет» достоверны; ² различия в группах «0–5 лет» и «11 лет и старше» достоверны; ³ различия в группах «6–10 лет» и «11 лет и старше» достоверны, ($p \leq 0,05$).

устойчивость к которым находилась на очень высоком уровне (90,91% исследованных штаммов). Устойчивыми к клотримазолу являлись 54,55% исследованных штаммов. Следует отметить, что нистатин продемонстрировал достаточно высокую эффективность *in vitro* (чувствительны более 68% исследованных штаммов) в отношении выделенных штаммов грибов рода *Candida*, что, по-видимому, связано с феноменом восстановления чувствительности к этому антимикотику после прекращения практики его широкого применения.

Заключение

Таким образом, в результате проведённого исследования было установлено, что у большинства пациентов (85,2%) с муковисцидозом в отделяемом респираторного тракта присутствует потенциально патогенная микрофлора, способная вызывать развитие хронических инфекционно-воспалительных процессов в бронхах и лёгких. Нами было показано, что достоверные различия в частоте обнаружения микроорганизмов у детей разных возрастных групп с муковисцидозом отсутствуют, а частота выделения устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий, как правило, не зависит от возраста пациента. При этом наи-

более частыми микроорганизмами, колонизирующими респираторный тракт таких пациентов, явились *P. aeruginosa* (42,6%), *S. aureus* (39,3%) и дрожжеподобные грибы рода *Candida* (32,8%). У 37,8% обследованных микроорганизмы обнаруживались в монокультуре, у 47,7% – в ассоциациях из двух (34,5%) или трёх (13,2%) видов микроорганизмов. Наиболее часто определяемой ассоциацией микроорганизмов в респираторном тракте пациентов является ассоциация *S. aureus* и *Candida spp.*

Среди штаммов стафилококков, выделенных от пациентов с муковисцидозом, 80% являются метициллинорезистентными, а наиболее эффективными *in vitro* антибиотиками в отношении большинства выделенных штаммов стафилококков являются хинупристин/дальфопристин, тигециклин, линезолид, ванкомицин и ко-тримоксазол. Наиболее эффективными *in vitro* антибиотиками в отношении *P. aeruginosa* (наименьшая частота встречаемости устойчивых штаммов) оказались меропенем и левифлоксацин. В отношении грибковой флоры наибольшую эффективность *in vitro* проявили амфотерицин В и нистатин (доля устойчивых штаммов составила, соответственно, 22,73% и 31,82%), в то время как более широко применяемые антимикотики

триазолового ряда показали существенно худшие результаты (54,55–90,91% устойчивых штаммов). Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения тщательного мониторинга видового состава микрофлоры респираторного

тракта пациентов с муковисцидозом и обязательным определением чувствительности её представителей к антимикробным средствам. Назначение эмпирической этиотропной терапии должно быть исключено.

Работа поддержана грантом БРФФИ № М16Р-160 «Изучение полиморфных вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков для оптимизации алгоритма подбора противомикробной химиотерапии при муковисцидозе».

Литература

1. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; 407: 762-4.
2. Häußler S, Tümmler B, Weissbrodt H et al. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(3): 621-5.
3. Soberon-Chavez G, Aguirre-Ramirez M, Ordonez L. Is *Pseudomonas aeruginosa* only «sensing quorum»? *Crit Rev Microbiol.* 2005; 31(3): 171-82.
4. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf.

Сведения об авторах:

Горбунов Владимир Анатольевич, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, ул. Филимонова, 23, 220114, E-mail: gorbunov@belriem.by, тел.: +375-17-267-32-67.

Пугач Валентин Валентинович, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, ул. Филимонова, 23, 220114, E-mail: valeomed@mail.ru, тел.: +375-29-276-26-28.

Шишпорёнок Юлия Александровна, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, ул. Филимонова, 23, 220114, E-mail: expert5@tut.by.

Аноп Анастасия Андреевна, ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, ул. Филимонова, 23, 220114, E-mail: boty-nastya92@yandex.ru.

Бобровнический Владимир Иванович, УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, пр. Дзержинского, 83, 220116.

Поступила 12.10.2017 г.