

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА

А.П.Смаль

Минский консультационно-диагностический центр

Муковисцидоз (МВ) – частое моногенное заболевание, имеющее ауто-сомно-рецессивный тип наследования, характеризующееся поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем и имеющее обычно тяжелое течение и прогноз.

Причина заболевания – мутации гена муковисцидозного трансмембранного регулятора (МВТР) – белка, обеспечивающего транспорт ионов хлора и натрия через апикальную часть мембраны эпителиальной клетки. Ген МВТР расположен в середине длинного плеча 7 хромосомы человека, содержит 27 экзонов, охватывает около 250 000 пар нуклеотидов. В настоящее время известно более 1800 мутаций гена муковисцидоза, наиболее часто встречается мутация $\Delta F 508$ (>50% случаев) [1].

В результате дефекта гена МВТР анионы хлора задерживаются в клетке, усиливают абсорбцию катионов натрия и воды, и, как следствие, происходит увеличение вязкости секрета, продуцируемого экзокринными железами, в том числе и бронхиального дерева (рисунок 1). Органами-мишенями для повреждающего действия при муковисцидозе являются верхние и нижние дыхательные пути, потовые, слюнные, половые железы, поджелудочная железа, кишечник и желчевыводящие пути.

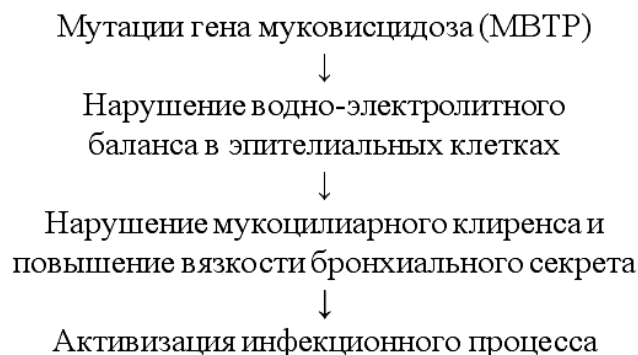


Рисунок 1 – Патогенез респираторных нарушений при муковисцидозе

Больные муковисцидозом на протяжении всей жизни страдают от хронических рецидивирующих инфекций, затрагивающих жизненно важные органы и системы организма, ведущим является поражение бронхолегочной и пищеварительной систем, а степень их вовлечения в патологический процесс и определяет исход заболевания. Бронхолегочные изменения доминируют в клинической картине, определяя ее течение и прогноз у 95% больных, и проявляются в виде рецидивирующих инфекций респираторного тракта, которые являются основной причиной заболеваемости, частых госпитализаций и смертности при этой патологии. Сочетание гиперсекреции вязкой мокроты с нарушением клиренса бронхов ведет к мукоцилиарной недостаточности, скоплению мокроты в мелких дыхательных путях. Воспа-

лительному процессу в бронхах предшествует вирусное поражение верхних дыхательных путей, ведущее к гибели клеток мерцательного эпителия и проникновению бактериальной флоры с последующим развитием хронической бактериальной инфекции в виде бронхитов, бронхолитов, пневмоний, постоянным и прогрессирующим снижением легочной функции. Дыхательные пути пациентов с МВ характеризуются врожденной чувствительностью к внешним оппортунистическим патогенам. Спектр микроорганизмов, выделяемых из верхних и нижних отделов дыхательного тракта больных с МВ, достаточно ограничен и отличается от микробного пейзажа отделяемого респираторных путей людей с другой бронхолегочной патологией (таблица 1).

Таблица 1 – Спектр микроорганизмов, выделяемых из бронхиального секрета больных муковисцидозом [2]

Микроорганизм	Частота	Роль в развитии легочных инфекций у больных муковисцидозом
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59	Доказана
<i>Staphylococcus aureus</i>	48	Доказана
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	3	Доказана
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	Не доказана
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9	Маловероятна
<i>Burkholderia gladioli</i>	<1	Маловероятна
<i>Ralstonia spp</i>	<1	Маловероятна
<i>Pandoraeae spp</i>	<1	Возможна
<i>Mycobacterium spp</i>	13	Доказана
<i>Haemophilus influenzae</i>	15	Возможна
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	Неизвестна
<i>Aspergillus fumigatus</i>	21-46%	Возможна
<i>Aspergillus flavus</i>	2-6%	Возможна
<i>Scedosporium apiospermum</i>	3-8%	Возможна
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1-6%	Возможна
РС - вирус	Нет данных	Доказана
Вирус гриппа	Нет данных	Доказана
Анаэробы	Нет данных	Возможна

Микробные агенты, вызывающие инфекции дыхательных путей у больных муковисцидозом, представлены бактериями, вирусами и грибами.

St.aureus – первый патоген, инфицирующий и колонизирующий дыхательные пути пациентов с МВ. Штаммы, выделяемые от больных с данной патологией, обладают выраженным тропизмом к эпителию воздухоносных путей за счет продукции адгезинов. Высеивается с наибольшей частотой у детей в возрасте до 10 лет. MRSA (метициллин-резистентный *St.aureus*) штаммы проявляют высокую степень резистентности к антибактериальным препаратам, являются важными патогенами в лечебных учреждениях и могут быть причиной серьезных инфекций.

Данные о влиянии золотистого стафилококка на легочную функцию недостаточны и противоречивы, однако для взрослых пациентов с МВ приобретение MRSA ассоциировано с ухудшением легочной функции [3].

Ps.aeruginosa – доминирующий этиологический агент при муковисцидозе (более 80% взрослых пациентов инфицированы синегнойной палочкой). Наиболее частым источником данного патогена в природе является вода, загрязненная продуктами животного происхождения. Распространение штаммов синегнойной палочки среди пациентов с МВ осуществляется посредством социальных контактов и через контаминированные источники в окружающей среде. Данный патоген обладает способностью к образованию биофильмов, позволяющих легко адаптироваться к изменяющейся среде обитания, и может трансформироваться в мукоидные формы, более устойчивые к действию антибиотиков и факторов иммунной защиты. Массивный рост синегнойной палочки может маскировать другие медленно растущие и прихотливые микроорганизмы такие, как *H.influenzae*. Выделение *Ps.aeruginosa* из бронхолегочного секрета связано со значительным ухудшением прогноза и прогрессирующим снижением легочной функции. Имеются данные о появлении эпидемических штаммов синегнойной палочки (LES-Ливерпульский эпидемический штамм), обладающих полирезистентностью к антибактериальным препаратам и высокой трансмиссивностью [4].

Burkholderia cepacia complex (ВСС) – важный патоген, ассоциирован с увеличением уровня заболеваемости и смертности больных МВ [5]. Комплекс состоит из 17 близкородственных видов – геномоваров. ВСС – естественные почвенные бактерии, найденные в ризосфере, могут быть симбионтами и патогенами. Все штаммы могут распространяться между МВ пациентами посредством социальных контактов и при оказании стационарной медицинской помощи. Вызывает «сераси́а-синдром» с быстро прогрессирующей некротизирующей пневмонией, сепсисом вплоть до летального исхода. Доказана роль геномовара *B.sepocercia*, особенно эпидемического штамма ET-12, обладающего высокой трансмиссивностью и патогенностью, в возникновении вспышек со смертельным исходом в США и Канаде в 1980-90 гг. прошлого столетия [6, 7]. Выделение микроорганизмов рода *Burkholderia* является негативным фактором для легочной трансплантации вследствие развития возможных осложнений и неблагоприятного исхода заболевания. Факторы патогенности представителей ВСС, которые вызывают тяжелые поражения дыхательной системы, до настоящего времени не известны. Точная и своевременная микробиологическая диагностика представителей ВСС является залогом ранней эффективной терапии возможных осложнений и проведения эпидемиологических мероприятий, предупреждающих распространение инфекции в пределах популяции больных МВ.

Нетуберкулезные микобактерии (НТБ). Инфекции, вызванные быстрорастущими НТБ, могут быть причиной тяжелых поражений дыхательной системы. Наиболее часто выделяются *M.abscessus*, *M.avium*, *M.chelonae* [8].

В настоящее время трудно разделить категории: кратковременная контаминация, колонизация и истинная инфекция.

Вирусы (гриппа А и В, РС-вирус, аденовирус и др.) играют роль пускового фактора в развитии обострений легочного процесса. У детей отмечается повышенная восприимчивость к бактериальной инфекции, особенно вызванной *Ps.aeruginosa*, после перенесенной РС-инфекции.

Грибы плесневые. Наиболее часто у больных муковисцидозом выделяются грибы рода *Aspergillus (A.fumigatus)* [7], вызывающие поражения дыхательных путей по типу аллергического бронхолегочного аспергиллеза, аспергилломы, бронхита. Патогенная роль грибов возрастает для больных МВ после пересадки легких. Взрослые пациенты с МВ инфицированы аспергиллами в большей степени, чем дети. В последнее время возрастает роль в патологии бронхолегочного процесса грибов *Scedosporium apiospermum*, появление которых способствует прогрессирующему ухудшению легочной функции.

Грибы дрожжеподобные. Candida spp. часто встречается в мокроте больных МВ. Отмечена колонизация грибов рода *Candida* у пациентов, получающих антибактериальную терапию. *Candida albicans* влияет на развитие осложнений у больных после пересадки легких вплоть до некротизирующего процесса в бронхах.

У детей наиболее часто из отделяемого верхних дыхательных путей высеваются микроорганизмы *H.influenzae*, *Str.pneumoniae*.

Другие неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии (НФГОБ) – *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandoraea spp.*, *Ralstonia spp.* и др. Появление НФГОБ обусловлено внедрением и развитием новых методов микробиологической диагностики, которые способствовали повышению качества идентификации микроорганизмов. Селекция новых бактерий связана с длительным применением антибиотиков в отношении *Ps.aeruginosa* и увеличением продолжительности жизни больных. Инфицирование штаммами НФГОБ происходит в период госпитализации пациента в стационар, т.е. является по своей сути нозокомиальным. Неферментеры характеризуются выраженной резистентностью к антибактериальным препаратам, устойчивость может быть как природной (*Stenotrophomonas maltophilia*, ВСС), так и приобретенной.

Оказание качественной помощи пациентам с муковисцидозом зависит от своевременной микробиологической диагностики. Ранняя адекватная антибактериальная терапия улучшает течение и прогноз заболевания, предупреждает развитие необратимых бронхолегочных осложнений.

Микробиологическая диагностика муковисцидоза – узкая область диагностической клинической микробиологии, требующая новых современных подходов для идентификации «сложных» микроорганизмов, колонизирующих/ инфицирующих дыхательные пути больных МВ.

Особенности микробиологической диагностики:

- бактериальные инфекции дыхательной системы являются преобладающими и представлены ограниченным числом оппортунистических микроорганизмов (*St.aureus*, *Ps.aeruginosa*, *Burkholderia cepacia complex*, нетуберкулезные микобактерии и др. НФГОБ);

- сложность микробиологической диагностики МВ обусловлена особенностями метаболизма инфекционных агентов, появлением атипичных фенотипов, гипермутабельных и эпидемических штаммов микроорганизмов.

Этапами микробиологической диагностики муковисцидоза являются изоляция и идентификация этиологических агентов в исследуемом материале путем определения морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических свойств микробных агентов (панели API 20 NE, ID 32 GN, API Candida, API NH и др.), исследование чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом с использованием среды Мюллер-Хинтон и проведение последующей интерпретации результатов.

Все НФГОБ должны быть идентифицированы до видового уровня, что является залогом грамотной и эффективной антибактериальной терапии.

Точная идентификация НФГОБ, выделенных из респираторных образцов больных МВ, поднимает ряд проблем:

- сложность определения вида микроорганизмов связана с высоким уровнем генетических мутаций и обусловлена высокой селективной нагрузкой, вызванной проводимой антимикробной терапией; микроорганизм приобретает свойства, помогающие ему выжить в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды: атипичная морфология колоний, потеря пигментации, мукоидный фенотип, медленный или ауксотрофный рост;

- этиологическая расшифровка микроорганизмов ограничена только определением биохимического профиля МВ патогенов с использованием коммерческих API тест-систем, имеется острая необходимость использования более современных молекулярно-биологических методов диагностики как более чувствительных, специфичных и достоверных в сравнении с фенотипическими методами;

- ошибки в идентификации МВ патогенов (чаще всего ВСС) имеют важные клинические последствия, приводящие к дорогостоящей неподходящей, ненужной антибактериальной терапии и необоснованной изоляции пациентов при проведении мероприятий по инфекционному контролю [9].

Определение профиля антимикробной чувствительности МВ патогенов ставит своей целью выбор наиболее эффективной и адекватной антибактериальной терапии обострений хронической бронхолегочной инфекции и точное установление эпидемиологии резистентности. Диско-диффузионный метод и метод E-тестов рекомендованы для определения чувствительности инфекционных агентов к антибиотикам как наиболее точные, достоверные и воспроизводимые. Коммерческие автоматизированные системы для тестирования антибактериальной чувствительности МВ пато-

генов не приемлемы из-за большого количества некорректных результатов (ложная чувствительность, ложная резистентность) [9]. Инфекционный агент считается полирезистентным, если проявляет устойчивость ко всем антибактериальным препаратам из не менее двух следующих классов: β -лактамы, фторхинолоны и аминогликозиды. Неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии – это ниша патогенов, которые первоначально являются причиной оппортунистических инфекций, связанных с учреждениями здравоохранения. Множественная резистентность у неферментеров делает лечение инфекций, вызываемых этими патогенами, сложным и дорогим. Пути решения проблемы множественной антибиотикорезистентности у МВ патогенов являются: ранняя адекватная антибактериальная терапия, своевременное проведение мероприятий по инфекционному контролю за заболеваемостью, усовершенствование методов определения чувствительности к антибиотикам в отношении штаммов, экспрессирующих β -лактамазы и определение синергических комбинаций антибиотиков.

Основные пути улучшения качества микробиологической диагностики муковисцидоза:

- создание условий для качественного посева биологического материала на питательные среды (ламинарный шкаф 2 класса биологической безопасности);
- использование специальных селективных питательных сред для изоляции редких прихотливых, медленно растущих микроорганизмов;
- совершенствование методов родовой и видовой идентификации плесневых грибов;
- внедрение молекулярно-биологических методов диагностики для идентификации этиологических агентов, для которых доказана бесспорная клиническая значимость (*Burkholderia cepacia complex*, нетуберкулезные микобактерии, редкие неферментеры).

Литература

1. Муковисцидоз: современные достижения и актуальные проблемы. Методические рекомендации / под ред. Н.И.Капранова, Н.Ю.Каширской. – Москва: Медико-генетический научный центр РАМН, 2011. – 92 с.
2. Gilligan, Cystic fibrosis microbiology / P.H.Gilligan, D.L.Kiska, M.D.Appleman. – Washington: ASM Press, 2006.
3. Thomas, S.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact at a national cystic fibrosis centre / S.R.Thomas [et al.] // J. Hosp. Infect. – 1998. – Vol. 40, № 3. – P. 203-209.
4. Fothergill, J.L. Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations / J.L.Fothergill [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 59, № 4. – P. 472-481.
5. Henry, D.A. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium / D.A.Henry // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35, № 3. – P. 614-619.
6. Govan, J.R.W. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia complex* in cystic fibrosis infection / J.R.W.Govan, A.L.Brown, A.M.Jones // Future Microbiol. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P.153-164.

7. Foweraker, J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis / J.Foweraker // Br. Med. Bull. – 2009. – Vol. 89. – P. 93-110.

8. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group ed. by M.Denton. – UK; Cystic Fibrosis Trust, 2010. – 64 p.

9. Saiman, L. Cystic Fibrosis Foundation. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission / L.Saiman, J.Siegel // Infect. Control Hosp. Epidemiol. – 2003. – Vol. 24, № 5. – P. 6-52.