

616-093/-098

DOI: 10.14427/jipai.2019.3.71

Гетерогенность популяции штаммов рода *Burkholderia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации

О.В. Кондратенко

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Самара, Россия

Heterogeneity of *Burkholderia* strains isolated from patients with cystic fibrosis in Russian Federation

O.V. Kondratenko

Samara State Medical University of Minzdrav of Russia, Samara, Russia

Аннотация

Муковисцидоз является наиболее частым генетическим заболеванием, продолжительность жизни при котором во многом определяется тяжестью респираторной инфекции. Колонизация легких бактериями рода *Burkholderia* значительно ухудшает прогноз заболевания. В процессе хронической инфекции в популяции бактерий формируются различные клональные варианты, различающиеся по ряду признаков, включая антибиотикорезистентность. В проведенном исследовании впервые в Российской Федерации проведена оценка степени гетерогенности штаммов бактерий рода *Burkholderia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом. Показано, что из одного респираторного образца могут выделяться два и более морфотипов, различающихся по своей антибиотикорезистентности. При этом морфотипы мелких колоний являются достоверно более устойчивыми к меропенему и цефтазидиму, по сравнению с нормальными морфотипами.

Ключевые слова

Муковисцидоз, гетерогенность, штамм, *Burkholderia*

Введение

Муковисцидоз (МВ) является самым распространенным аутосомно-рецессивным заболеванием, обусловленным мутацией гена, расположенного на длинном плече 7 хромосомы. Заболевание является мультисистемным, поражающим преимущественно дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, печень, поджелудочную железу, а также слюнные, потовые железы, репродуктивную систему. Однако, патология со стороны дыхательных путей является

Summary

Cystic fibrosis is the most common genetic disorder, the life expectancy of which is largely determined by the severity of respiratory infection. Colonization of the lungs by bacteria of the genus *Burkholderia* significantly worsens the prognosis of the disease. In the process of chronic infection, various clonal variants are formed in the bacterial population, differing in a number of characteristics, including antibiotic resistance. The study was the first in Russian Federation to assess the degree of heterogeneity of strains of bacteria of the genus *Burkholderia* isolated from patients with cystic fibrosis. It is shown that two or more morphotypes differing in their antibiotic resistance can be distinguished from one respiratory sample. In this case, the morphotypes of small colonies are significantly more resistant to meropenem and ceftazidim, compared with normal morphotypes.

Keywords

Cystic fibrosis, heterogeneity, strain, *Burkholderia*

основной причиной осложнений и летальности. Генетический дефект, лежащий в основе патогенеза МВ, приводит к повышению вязкости респираторного секрета, что создает комфортные условия для роста и размножения бактериальной популяции [1, 2, 3].

Наиболее «проблемными» возбудителями при МВ считаются бактерии *Burkholderia cepacia complex*, способные приводить к формированию хронической инфекции, приводящей в 20% случаев к развитию «серасиа-синдрома» [1, 2, 3].

Виды *Burkholderia* характеризуются высокой пластичностью генома, что дает им большое преимущество в адаптации в стрессовой среде легких [6, 8, 9]. Широко распространенное положительное селективное давление в геноме *Burkholderia spp.* приводит к появлению множества фенотипических клональных вариантов, которые демонстрируют различные паттерны антибиотикорезистентности и другие различия [5, 7, 10].

Первым случаем описания гетерогенности популяции буркхольдерий при МВ следует считать публикацию исследователей из Португальского центра МВ, в которых авторы приводят описание 2 пар малых и «нормальных» морфотипов данных бактерий, выделенных из мокроты пациентов с МВ. При этом авторами исследования показано, что малые колониальные варианты показали себя более устойчивыми к антибактериальным препаратам, а также к ультрафиолетовому облучению. Первое обстоятельство может приводить к неэффективности лечения при использовании стандартных схем терапии, а второе – повышать сроки выживания возбудителей на объектах окружающей среды, тем самым, повышая вероятность распространения указанного морфотипа среди пациентов. Кроме того, малые колониальные варианты оказались более активными пленкообразователями, по сравнению с колониями стандартного размера, а также, более вирулентными [11].

Цель – оценить гетерогенность популяции штаммов *Burkholderia spp.*, выделенных от пациентов с МВ из различных регионов Российской Федерации.

Методы: проведено исследование 244 проб мокроты от пациентов с МВ из различных регионов РФ, в которых был получен рост штаммов *Burkholderia spp.* Рост бактерий был получен на OFPB-агаре с последующей идентификацией выросших колоний с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии (Bruker, Microflex). Определение чувствительности выделенных морфотипов к антибактериальным препаратам проводилось в соответствии с требованиями CLSI, ввиду отсутствия данных по интерпретации значений диаметров зон задержки роста в отечественной литературе [12].

Результаты и обсуждение

За 2018-2019 гг. был получен рост бактерий рода *Burkholderia* в 242 (9,2%) респираторных образцах из 2640 исследованных от пациентов с МВ из различных регионов РФ.

При этом за 2018 год указанных штаммы были выделены в 134 (53,4%) пробах респираторных образцов от пациентов с МВ. В подавляющем большинстве случаев, были выделены штаммы *V.cenoseracia* – в 116 (85,5%) пробах. В большинстве выделенных проб – 108 (93,1%) – отмечался рост в виде морфологически однородной популяции. В 8 (6,9%) пробах был отмечен рост в виде гетерогенной популяции штамма с формированием фенотипа колоний нормального размера и фенотипа мелких колоний.

Мы предположили, что различные морфологические варианты штамма могут отличаться по ряду признаков, в том числе и по антибиотикорезистентности. Ввиду этого, нами была проведена оценка антибиотикорезистентности различных морфологических вариантов штаммов *Burkholderia* диско-диффузионным методом. Поскольку российские нормативные документы по определению чувствительности к антибактериальным препаратам, а также стандарты EUCAST, не регламентируют возможность оценки чувствительности бактерий данной группы, а своей работе мы использовали критерии CLSI. Мы провели сравнительную оценку чувствительности выделенных морфотипов к 3 препаратам, для которых в указанном документе имеются критерии интерпретации зон задержки роста: меропенему, цефтазидиму и котримоксазолу. Даже учитывая незначительные перечни тестируемых препаратов, нами были выявлены существенные различия в резистентности морфотипов, полученных в рамках одного биообразца. Так, среди 8 проб, в которых был получен рост *V.cenoseracia*, имеющей признаки морфологической гетерогенности только в 1 (12,5%) пробе оба морфотипа имели идентичную антибиотикорезистентность, а в остальных 7 (87,5%) пробах были получены различные данные по чувствительности у нормальных и мелких морфотипов. Таким образом, среди 116 проб, в которых был получен рост *V.cenoseracia* было получено 132 морфологически различных изолята.

Нами было выделено 2 (1,5%) штамма *V.multivorans*. Оба штамма давали рост в виде морфологически однородной культуры.

Также было выявлено 3 (2,3%) штамма *V.stabilis*, 7 (5,2%) штаммов *V.contaminans* и 1 (0,8%) штамм *V.vietnamensis*. Все перечисленные штаммы давали рост в виде морфологически однородной популяции.

В 5 (3,7%) пробах был получен рост культуры *V.gliadioli*, при этом в 4 образцах в виде морфо-

логически однородной популяции, а в 1 пробе в виде морфологически гетерогенной популяции с различной антибиотикорезистентностью.

Таким образом, за 2018 год было получено 143 изолята из 136 проб, в которых был получен рост культуры бактерий рода *Burkholderia*.

За 11 месяцев 2019 года бактерии рода *Burkholderia* были выделены в 108 (46,6%) пробах респираторных образцов от пациентов с МВ.

При этом, в подавляющем большинстве случаев, были выделены штаммы *B.cenoseracia* – в 87 (80,6%) пробах. В большинстве выделенных проб – 47 (54,0%) – отмечался рост в виде морфологически однородной популяции. Однако, в 39 (46,0%) пробах был отмечен рост в виде гетерогенной популяции штамма с формированием фенотипа колоний нормального размера и фенотипа мелких колоний. При оценке антибиотикорезистентности выделенных гетерогенных изолятов в 9 (23,1%) пробах выявлена идентичная антибиотикорезистентность, а в 30 (76,9%) пробах – нормальные и мелкие морфотипы имели значительные различия в антибиотикорезистентности. Таким образом, среди 87 проб, в которых был получен рост *B.cenoseracia* было получено 165 морфологически различных изолятов.

Нами было проведено выборочное исследование достоверности различий в чувствительности к антибактериальным препаратам у 21 полученных гетерогенных образцов (43 морфотипов) *Burkholderia cenoseracia* в соответствии с критериями CLSI. При этом в 20 образцах присутствовало по 2 морфотипа колоний (нормальные и мелкие), а в 1 образце – 3 морфотипа (нормальные, мелкие и пигментированные).

В результате проведенного исследования выявлен достоверный уровень различий в чувствительности нормальных и мелких изолятов с использованием критерия Манна-Уитни к меропенему и цефтазидиму. При этом, нормальные морфотипы характеризовались более высоким уровнем чувствительности к указанным препаратам, по сравнению с мелкими морфотипами (табл. 1).

При оценке различий в антибиотикорезистентности с использованием критерия Манна-Уитни к ко-тримоксазолу у нормальных и мелких морфотипов не было установлено достоверных различий среди исследуемой выборки (табл. 2).

В 4 (3,7%) пробах был получен рост *B.contaminans*, при этом в 2 (50,0%) пробах в виде морфологически однородной бактериальной популяции, а в 2 (50,0%) пробах в виде гетерогенной культуры с 3 - нормальными, малыми и пигментированными – морфотипами колоний с различной антибиотикорезистентностью у каждого варианта. Таким образом, было получено 8 изолятов из 4 проб.

В 9 (8,3%) пробах был получен рост *B.stabilis*, при этом в 6 (66,7%) пробах популяция была морфологически гомогенной, а в 3 (33,3%) пробах были получены гетерогенные культуры. Из них в 1 пробе – с идентичной чувствительностью, а в 2 – с различной. Таким образом, из 6 проб было получено 12 изолятов.

Нами было получено 3 (2,8%) пробы, в которых был рост культуры *B.multivorans*. При этом в 2 пробах отмечен рост в виде морфологически однородной культуры, а в 1 пробе – в виде гетерогенной культуры с различной антибиотикоре-

Таблица 1. Статистические различия в виде среднего и его ошибки с использованием критерия Манна-Уитни

| Тестируемый препарат | Размер колоний | | | | P |
|----------------------|----------------|----------|------------------|---|-------|
| | нормальные | мелкие | пигментированные | | |
| | Mean±m | Mean±m | Mean | m | |
| меропенем | 18,8±1,0 | 13,2±1,1 | 18,0 | . | 0,001 |
| ко-тримоксазол | 11,8±1,6 | 9,4±1,8 | 22,0 | . | 0,150 |
| цефтазидим | 26,6±1,0 | 20,1±1,8 | 18,0 | . | 0,012 |

Таблица 2. Статистические различия в виде среднего и стандартного отклонения с использованием критерия Манна-Уитни

| | Размер колонии | | | | P |
|----------------|----------------|----------|------------------|----|-------|
| | нормальные | мелкие | пигментированные | | |
| | Mean±SD | Mean±SD | Mean | SD | |
| меропенем | 18,8±4,6 | 13,2±5,0 | 18,0 | . | 0,001 |
| ко-тримоксазол | 11,8±7,3 | 9,4±8,3 | 22,0 | . | 0,150 |
| цефтазидим | 26,6±4,4 | 20,1±8,3 | 18,0 | . | 0,012 |

зистентностью. Таким образом, в 3 пробах было выявлено 4 изолята.

В 5 (4,6%) пробах был получен рост культуры *B.gladiali*, при этом во всех образцах в виде морфологически однородной популяции.

Таким образом, за 2019 год было получено 194 изолята из 87 проб, в которых был получен рост культуры бактерий рода *Burkholderia*.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют, что в рамках одного ре-

спираторного образца могут присутствовать различные изоляты штаммов бактерий рода *Burkholderia*, отличающиеся не только по своим морфологическим свойствам, но и по антибиотикорезистентности. Данное обстоятельство необходимо принимать во внимание как врачам-бактериологам при микробиологической диагностике, в виде учета гетерогенности культур и морфотипов колоний, так и врачами-клиницистами при корректировке терапии и прогнозировании рисков возможных осложнений.

Литература

1. Афанасьева М.В., Амелина Е.Л., Черняк А.В. и др. Выживаемость взрослых больных муковисцидозом с хронической инфекцией респираторного тракта, обусловленного микроорганизмами *Burkholderia cepacia* complex. Практическая пульмонология 2018; №1: 60–64.
2. Воронина О.Л., Чернуха М.Ю., Шагинян И.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.
3. Красовский С.А., Афанасьева М.В., Амелина Е.Н. и др. Инфицирование респираторного тракта микроорганизмами *B. cepacia* complex как неблагоприятный прогностический фактор у больных муковисцидозом. Сибирское медицинское обозрение 2019; №2: 89–94.
4. Berry M.C., McGhee G.C., Zhao Y. et al. Effect of a *waaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. W.FEMS Microbiol. Lett. 2009; Vol. 291: 80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01438.x>
5. Coutinho C.P., De Carvalho C.C., Madeira A. et al. *Burkholderia cenocepacia* phenotypic clonal variation during a 3.5-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. Infect. Immun. 2011; Vol. 79: 2950–2960. <https://doi.org/10.1128/IAI.01366-10>
6. Coutinho C.P., dos Santos S.C., Madeira A. et al. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. Front Cell Inf Microbio. 2011; Vol. 1: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00012>
7. Cunha M.V., Sousa S.A., Leitão J.H. et al. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. J Clin Microbiol. 2004; Vol. 42: 3052-3058. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3052-3058.2004>
8. Döring G., Parameswaran I.G., Murphy T.F. Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. FEMS Microbiol. Rev. 2011; Vol.35: 124–146.
9. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology. 2007; Vol. 153: 917–923. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004077-0>
10. Lieberman T.D., Michel J.B., Aingaran M. Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. Nat. Genetics. 2011; Vol. 43: 1275–1280. <https://doi.org/10.1038/ng.997>
11. Punto-de-Oliveira A., Coutinho C.P., C.G. Ramos et al. The *Burkholderia cepacia* smalli colony variants (SCV) are a more pathogenic bacterial form that may facilitate persistent respiratory infections in CF patients. J Cyst. Fibros. 2013; S76. [http://dx.doi.org/10.1016/S1569-1993\(13\)60251-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1569-1993(13)60251-9)
12. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 13th Edition/ <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents>

Статья участвует в конкурсе публикаций 2019 г. в категории "Инфектология". Страница голосования: <https://vk.com/immunopathology>