

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.ГАМАЛЕИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Сиянова Екатерина Алексеевна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ
КАК ОСНОВА ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ЛЕГКИХ, ВЫЗВАННОЙ БАКТЕРИЯМИ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA, У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук Чернуха М. Ю.

Москва 2025

*Посвящается светлой памяти доктора медицинских наук
Игоря Андрониковича Шагиняна*

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Эпидемиологическая характеристика хронической инфекции легких у больных с муковсцидозом.....	15
1.2 Микробиологические агенты, осложняющие течение МВ.....	18
1.3 Микробиологическая характеристика <i>P. aeruginosa</i>	21
1.3.1 Особенности биологии бактерий рода <i>Pseudomonas</i> , клиническое значение для человека и особенности геномной структуры <i>P. aeruginosa</i>	21
1.3.2 Факторы патогенности бактерий <i>P. aeruginosa</i>	25
1.3.3 Формирование биопленок <i>P. aeruginosa</i> при хронической инфекции легких у больных МВ.....	30
1.4 Эпидемиологическое значение резистентных штаммов <i>P. aeruginosa</i> к антимикробным препаратам.....	33
1.5 Идентификация бактерий <i>P. aeruginosa</i>	38
1.6 Молекулярная эпидемиология хронической инфекции легких, вызванной <i>P. aeruginosa</i> , у пациентов с МВ.....	40
1.7 Заключение.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1 Материалы.....	47
2.2 Методы.....	48
ГЛАВА 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ЛЕГКИХ, ВЫЗВАННОЙ <i>P. AERUGINOSA</i>	57
3.1 Микробиологические особенности хронической инфекции легких, вызванной <i>P. aeruginosa</i>	57
3.2 Характеристика пациентов с хронической инфекцией легких, вызванной <i>P. aeruginosa</i>	61

3.3 Результаты микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной <i>P. aeruginosa</i>	64
3.4 Микробиологическая характеристика коллекции штаммов <i>P. aeruginosa</i> , выделенных из мокроты детей и взрослых больных муковисцидозом.....	78
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОЛЯТОВ <i>P. AERUGINOSA</i>	82
4.1 Результаты молекулярных исследований изолятов <i>P. aeruginosa</i> , выделенных от пациентов МВ.....	82
4.2 Анализ распространения в мире 17 сиквенс-типов <i>P. aeruginosa</i> , выделенных от пациентов с муковисцидозом, по данным международной базы	84
4.3 Мониторинг антибиотикочувствительности изолятов <i>P. aeruginosa</i> к антимикробным препаратам	97
4.4 Исследование генов металло- β -лактамаз <i>P. aeruginosa</i> пациентов МВ.....	113
ГЛАВА 5. МИКРОФЛОРА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ ВНЕ СТАЦИОНАРА.....	118
5.1 Характеристика условий проживания детей, больных МВ.....	118
5.2 Мониторинг микрофлоры внешней среды в домашних условиях проживания пациентов.....	122
ГЛАВА 6. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ <i>P. AERUGINOSA</i> К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ СРЕДСТВАМ	131
6.1 Исследование чувствительности изолятов <i>P. aeruginosa</i> к дезинфицирующим средствам, предназначенным для обеззараживания медицинских изделий.....	132
6.2 Исследование чувствительности <i>P. aeruginosa</i> к дезинфицирующим средствам в растворе.....	136

6.3 Исследование чувствительности изолятов <i>P. aeruginosa</i> к дезинфицирующим средствам, предназначенным для обеззараживания поверхностей.....	140
ГЛАВА 7. МЕРЫ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ БАКТЕРИЯМИ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> В СТАЦИОНАРЕ И ДОМАШНИХ УСЛОВИЯХ ПРОЖИВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ.....	146
7.1 Разработка алгоритма микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом, вызванной бактериями <i>P. aeruginosa</i>	147
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	155
ВЫВОДЫ.....	166
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	168
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	170

Введение

Актуальность темы и степень ее разработанности

Pseudomonas aeruginosa - это условно-патогенный микроорганизм, способный вызывать инфекции с широким спектром клинических проявлений – от локализованных повреждений органов и тканей до генерализованной инфекции (бактериемия, сепсис) [Мороз А.Ф., 1988; Брико Н.И., Покровский В.И., 2017]. Особое место *P. aeruginosa* занимает в развитии инфекций нижних дыхательных путей у больных с кистозным фиброзом (муковисцидозом), у которых этот возбудитель играет важную роль [Шагинян И.А., Капранов Н.И., 2010, Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., 2021].

Муковисцидоз (МВ) - генетическое заболевание, при котором продолжительность жизни больного напрямую связана со степенью поражения бронхолегочной системы. Вследствие мутации гена CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) снижение количества ионов хлора вызывает усиленную абсорбцию ионов натрия, что приводит к дегидратации околоклеточного пространства и сгущению секрета экзокринных желез. Накопление вязкого секрета является благоприятной средой для размножения бактерий и развития хронической инфекции легких (ХИЛ), которая является причиной смертности при МВ у 80-95% пациентов [Matsui H. 2005, Thomas S.R. 2003]. Средний возраст умерших пациентов в РФ составляет 23.7 лет [Регистр, 2021].

Согласно данным регистра 2021 г частота хронического инфицирования *P. aeruginosa* у пациентов с МВ составляет 33,6% (у детей – 25,4%, у взрослых – 53,2%). У пациентов, инфицированных *P. aeruginosa*, наблюдается более быстрое снижение функции легких, а после обострения, вызванного *P. aeruginosa*, не удается восстановить полноценную функцию легких. Такие пациенты получают больше курсов внутривенной антибактериальной терапии, госпитализируются чаще, имеют задержку в развитии и короткую продолжительность жизни. Кроме того, такие пациенты могут быть источником

штаммов *P. aeruginosa* с высокой эпидемиологической значимостью.

P. aeruginosa относится к числу возбудителей госпитальных инфекций, поэтому госпитальные условия часто рассматривались как основной источник возбудителя для пациентов с МВ. В отличие от некоторых зарубежных стран [Cheng K., 1996, Jones A.M., 2001, Scott F.W., 2004, Jones A.M., 2005, Kidd T.J., 2012], внутрибольничные вспышки инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, среди больных МВ в РФ не регистрировали, хотя инфицирование госпитальными штаммами больных МВ было установлено. Ранее в работах лаборатории было предположено, что в преобладающем большинстве случаев больные с МВ в РФ инфицируются во внегоспитальных условиях [Сиянова Е. А, 2018, Аветисян Л.Р., 2019]. До настоящего времени не изучено значение окружающей домашней среды, не установлены основные источники возбудителя и возможные факторы передачи бактерий *P. aeruginosa* в домашних условиях. В связи с этим актуальным является выявление домашних очагов инфекции и разработка рекомендаций для профилактики инфицирования *P. aeruginosa* в домашних условиях при ежедневных гигиенических и лечебных процедурах пациентов с МВ. Необходимым условием такого рода исследований является установление спектра штаммов *P. aeruginosa*, персистирующих в домашних очагах и сравнения его с хорошо охарактеризованными нозокомиальными клонами.

Легкие больных МВ являются экологической нишей, где под постоянным воздействием антибиотиков благодаря мутациям и горизонтальному переносу генов могут формироваться мультирезистентные эпидемически значимые клоны *P. aeruginosa* [Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., 2017]. В связи с этим необходим постоянный мониторинг антибиотикочувствительности бактерий *P. aeruginosa* для исследования распространенности мультирезистентных эпидемически значимых клонов среди популяции больных МВ, а также для обеспечения врачей информацией для подбора адекватной антибиотикотерапии. Протокол лечения больных включает такие антибиотики, как беталактамы и карбапенемы, которые являются препаратами выбора для лечения тяжелых обострений. Инфицирование

бактериями *P. aeruginosa*, имеющими гены металло- β -лактамаз (M β L), представляет серьезную угрозу в процессе лечения больных МВ и инфекционного контроля. Актуальным является исследование распространенности генов антибиотикорезистентности среди изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ.

Для профилактики распространения *P. aeruginosa* при оказании помощи больным МВ в стационарных и амбулаторных условиях важным является правильный подбор дезинфицирующих средств. Данные о чувствительности бактерий *P. aeruginosa*, циркулирующих у пациентов с МВ к дезинфектантам малочислены или отсутствуют.

В результате постоянной антибиотикотерапии бактерии *P. aeruginosa* могут приобретать атипичный фенотип, что затрудняет диагностику инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, у больных муковисцидозом [Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Жуховицкий В.Г., 2017]. В результате больные с ложноотрицательным результатом не получают необходимое им лечение. В связи с этим необходимо усовершенствовать алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*, который позволит своевременно и точно поставить диагноз.

Таким образом, анализ результатов предшествующих исследований привел к выводу о необходимости разработки схемы мониторинга для включения ее в клинические рекомендации как основы мероприятий по снижению частоты ХИЛ, вызванной этим возбудителем.

Цель работы. Разработать схему микробиологического мониторинга *P. aeruginosa* у пациентов с МВ на основе микробиологической характеристики изолятов, выделенных у пациентов с муковисцидозом и подтвержденной хронической инфекцией легких.

Задачи.

1. Собрать коллекцию штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом с ХИЛ и из объектов внешней среды, связанной с такими больными.
2. Определить генотипы штаммов *P. aeruginosa*, распространенные среди больных муковисцидозом с подтвержденной ХИЛ, и провести сравнение с эпидемическими значимыми клонами *P. aeruginosa*
3. Охарактеризовать биологические свойства и антибиотикочувствительность изолятов *P. aeruginosa*.
4. Выявить распространенность и оценить значение генов металло- β -лактамаз для выявления эпидемически значимых штаммов *P. aeruginosa*.
5. Оценить эффективность современных дезинфектантов в отношении штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом.
6. На основе полученных результатов предложить усовершенствованную схему микробиологического мониторинга *P. aeruginosa* у больных МВ и улучшенную тактику профилактики инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, в условиях стационара и в домашней среде.

Новизна исследования

Впервые выявлены новые, ранее не описанные генотипы *P. aeruginosa*: ST4037, ST3993, ST4038, - сведения, о которых внесены в международную базу PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity - <https://pubmlst.org/>). Всего, в PubMLST внесены сведения о 34 изолятах *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ в РФ. Выявлен новый аллель гена «домашнего хозяйства» *trpE*, входящего в схему мультилокусного типирования, обозначенный как *trpE317*.

На основании полученных данных предложены дополнительные шаги в алгоритм микробиологической диагностики ХИЛ у больных с МВ: обязательное использование методов MALDI-TOF или ПЦР для идентификации изолятов, и

методов ПЦР и ПЦР-РеалТайм для характеристики МβЛ-маркеров эпидемически значимых штаммов.

Показано распространение среди штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих у пациентов с МВ на территории РФ, международных клонов высокого эпидемического риска ST233, ST235, ST245, ST274, ST273, ST381. Впервые охарактеризована вспышка госпитальной инфекции, вызванной штаммом *P. aeruginosa* ST235, среди детей больных МВ.

Впервые в РФ осуществлен детальный мониторинг домашней среды детей с МВ, и выявлено эпидемиологическое значение ряда предметов - небулайзеров, стоков раковин, чистящей поверхности зубных щеток, - как возможных резервуаров бактерий *P. aeruginosa*, потенциально приводящих к вторичной инфекции.

Практическая значимость

Разработана схема микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, с целью персонализированного подхода при профилактике и лечении ХИЛ у больных МВ. Доказано, что мониторинг должен включать не только бактериологические исследования, но и мониторинг антибиотикорезистентности возбудителя, мониторинг чувствительности к дезинфектантам с целью коррекции режимов дезинфекции, мониторинг микрофлоры домашней среды для предотвращения распространения *P. aeruginosa* и предупреждения инфицирования больных.

Разработаны рекомендации по тактике проведения профилактических мероприятий для предупреждения распространения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, как в условиях стационара, так и в домашних условиях. Полученные данные войдут при пересмотре в Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» и клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз)».

На основе полученных данных о чувствительности *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам обоснованы оптимальные режимы дезинфекции

различными препаратами для предупреждения распространения штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ.

Полученные данные о микробиологическом статусе больного передаются лечащим врачам-пульмонологам, на основе которых организуется прием пациентов в зависимости от характера микрофлоры для исключения их перекрестного инфицирования.

Полученные данные используются в лекционном курсе для студентов «МГИМО-МЕД» и аспирантов ФБГУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России по специальностям микробиология и эпидемиология.

Полученные результаты по исследованию антибиотикорезистентности штаммов *P. aeruginosa* включены в базу данных Референс-центра ФБГУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России по мониторингу распространения антибиотикорезистентности.

Собрана и охарактеризована по фенотипическим и генотипическим свойствам коллекция штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с муковисцидозом (402 изолята). Два штамма *P. aeruginosa*, полностью секвенированные были депонированы в коллекцию ФБГУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. (GIMC5040:PA85B, GIMC5041:PA431-2, 14.11.2022).

Методология и методы исследования

Методология исследования включала разработку алгоритма микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, включающего усовершенствование алгоритма идентификации бактерий *P. aeruginosa* для пациентов с МВ. Методической основой послужили бактериологические, эпидемиологические, физические и современные молекулярно-генетические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. *P. aeruginosa* продолжает оставаться одним из ведущих возбудителей пневмонии и респираторной инфекции у больных МВ, несмотря на усовершенствование лечения и профилактики хронической инфекции легких у таких больных.
2. Широкое распространение среди больных МВ атипичных форм *P. aeruginosa* требует включения в алгоритм микробиологической диагностики этиологии ХИЛ у пациентов с МВ методов, обеспечивающих выявление и правильную идентификацию возбудителя *P. aeruginosa* (более длительное инкубирование, применение Maldi-TOF или ПЦР, а также исследование на наличие генов МβЛ).
3. Наиболее распространенными и эпидемически значимыми для пациентов с МВ в РФ являются два генотипа *P. aeruginosa*: ST235 и ST274.
4. Показано существование домашних эпидемических очагов синегнойной инфекции в местах проживания больных детей с МВ, что обосновывает необходимость постоянного микробиологического мониторинга возможных резервуаров возбудителя в домашних условиях и их адекватную дезинфекцию
5. Показано, что изменения биологических свойств штаммов *P. aeruginosa* длительно персистирующих у пациентов с муковисцидозом влияют на устойчивость бактерий к режиму дезинфекции, заявленному производителем. В связи с этим для профилактики распространения *P. aeruginosa*, особенно в госпитальных условиях, необходимо изучать эффективность ДС, используемых в больнице или поликлинике, в отношении выделенных изолятов *P. aeruginosa*.

Апробация результатов. Тема диссертации утверждена на Ученом Совете ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (Протокол №4 от 20.04.2023). Апробация диссертации состоялась 26.06.2024 года на совместной научной конференции отделов медицинской микробиологии и эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (Протокол №29 от 26.06.2024).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 13 международных и всероссийских конференциях и конгрессах, в том числе на I Национальном конгрессе по наследственным заболеваниям легких с международным участием (Петергоф, 26-28.04.2024), 47 Европейской конференции по муковисцидозу (47th European Cystic Fibrosis Conference, Glasgow, 5–8 June 2024), XII Конгрессе с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) (Москва, 28-29 ноября 2024).

Декларация личного участия автора.

Основные результаты, представленные в диссертации получены лично автором. Исследования по отдельным разделам работы проводились совместно с сотрудниками лабораторий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России: индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Соловьевым А.И., Поляковым Н.Б. (под руковод. к.м.н. Жуховицкого В.Г.), молекулярной генетики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России (под руководством А.Г. Прилипова), анализа геномов Кунда М.С., Рыжовой Н.Н. и Аксеновой Е.И. (под руководством О.Л. Ворониной)..

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Основные научные положения диссертации соответствуют пп.11 (Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ), 12 (Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности), 20 (Санитарная микробиология) паспорта специальности 1.5.11 «Микробиология».

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 23 публикации, в том числе 6 статей, входящих в базы данных WoS, Scopus и РИНЦ, а также в перечень рецензируемых научных изданий рекомендуемых ВАК.

Степень достоверности результатов.

Достоверность результатов работы определяется использованием современных комплексных подходов к проведению бактериологических

исследований и использованию в исследованиях молекулярно-генетических методов и Maldi-TOF спектрометрии. Большое количество посевов образцов мокроты и мазков из дыхательных путей – 3900 проб, полученных от пациентов с МВ из различных регионов РФ в период с 2012 по 2022 гг., использование методов статистической обработки подтверждает обоснованность и достоверность полученных результатов исследований, выводов и практических рекомендаций.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, выводы, список литературы. Диссертация изложена на 193 страницах машинописного текста, иллюстрирована 42 рисунком, содержит 24 таблицы. Список литературы состоит из 197 источников, из них 61 – отечественные, 136 – зарубежные.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Эпидемиологическая характеристика хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом

Муковисцидоз - (mucus - слизь, viscidus - вязкий) наследственное заболевание, характеризующееся аутосомно-рецессивным типом наследования (Рисунок 1), с системным поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем организма, обусловленное мутацией гена CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator - трансмембранный регулятор муковисцидоза). Ген CFTR является трансмембранным регулятором проводимости ионов натрия и хлора. В результате нарушения транспорта ионов хлора через апикальную мембрану клеток эпителия происходит накопление ионов натрия, что обуславливает усиленное всасывание воды из околоклеточного пространства. Таким образом, происходит сгущение секрета экзокринных желез и затрудняется его эвакуация. Приблизительно 2000 мутаций этого гена были выявлены, из которых около 120 являются причиной подавляющего большинства случаев заболевания. По состоянию на 7 апреля 2023 года на сайте международного проекта CFTR2 [1] показано 719 патогенных генетических вариантов нуклеотидной последовательности гена CFTR (ГВНП CFTR). Различают 7 классов мутаций гена CFTR в зависимости от степени влияния на функцию белка CFTR: 1 класс – белок не синтезируется, 2 класс – белок не сворачивается, 3 класс – хлорный канал не функционирует, 4 класс - функция хлорного канала снижена, 5 класс – снижено количество белка, 6 класс - белок не стабилен, 7 класс – отсутствует мРНК. Варианты нуклеотидной последовательности гена CFTR 1-3 классов мутаций относятся к «тяжелым» вариантам, при вариантах 4-6 классов сохраняется остаточная функция хлорного канала, что позволяет их отнести в группу «мягких» вариантов мутаций нуклеотидной последовательности гена CFTR MB [2,3].

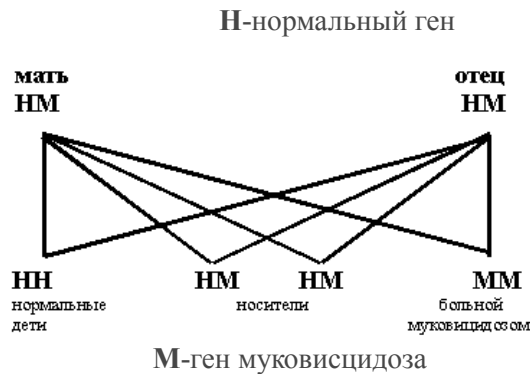


Рисунок 1. Аутосомно-рецессивный тип наследования при МВ (<https://en.ppt-online.org/52949>)

При муковисцидозе (МВ) наблюдается патологические процессы в органах дыхания, поджелудочной железе, желудочно-кишечном тракте, печени, репродуктивной системе и потовых железах. В Европе около 35 000 людей больных муковисцидозом. Уровень распространенности в США и Канаде составляет 30000 и 3000, соответственно. МВ также распространен среди населения таких стран, как Австралия, Новая Зеландия, на Ближнем Востоке, Иране, Пакистане, Индии и Латинской Америке [4]. В Европе частота заболевания МВ составляет в среднем 1:2000-1:3000 новорожденных. В Российской Федерации частота заболевания ниже - 1:10000, при этом она значительно варьирует в разных регионах [3,5].

В 30-е годы XX века 70% больных МВ погибали на первом году жизни. В 90-е годы средняя продолжительность жизни больных МВ в США и странах Западной Европы составляла 29 лет. В России данный показатель на тот момент достигал лишь 18 лет [6]. В настоящее время, если применяется комплексное лечение (диета, медикаментозное лечение, антибиотикотерапия, лечебная физкультура), средняя ожидаемая продолжительность жизни больных МВ составляет более 35 лет, а в некоторых странах (Великобритания, США, Австралия) до 50 лет. Проведенный в РФ расчет медианы ожидаемой продолжительности жизни для пациентов, родившихся за 2014-2018 год, составил 33 года. Доверительный интервал находится в пределах 30-37 лет.

Благодаря внедрению в 2006 году в Российской Федерации государственной программы обязательного неонатального скрининга на муковисцидоз [7], увеличилось количество пациентов в возрасте до 1 года, которым был установлен диагноз с 45% до 70%. Благодаря этому появилась возможность раннего выявления больных и назначения своевременного лечения [8]. В 2021 году диагноз муковисцидоз по неонатальному скринингу был установлен 65,8% пациентам.

По результатам сравнительного анализа пациентов с МВ, проживающих на территории средней полосы Европейской части России, юге страны и Сибири количество вновь выявленных больных МВ значительно увеличилось во всех изучаемых регионах за период с 2011 по 2015 г.: в Москве и Московской области - на 32,3%, в Краснодарском крае - на 29,2%, в Красноярском крае - на 65,8%. [9].

Согласно Регистру больных муковисцидозом в Российской Федерации и по данным «Программы 14 высокочатотных нозологий» Министерства Здравоохранения РФ на 1 января 2021 года общее число больных муковисцидозом в России составляют 4259 человек, из них 27,4% - взрослые. В 2021 году диагноз муковисцидоз впервые установлен 158 пациентам. Минимальный возраст установления диагноза – при рождении, максимальный – 59,5 лет. Средний возраст больных в 2021 году составил $14,0 \pm 9,8$ лет, медиана возраста – 11,9 лет. Возраст самого старшего пациента соответствовал 64,1 года, возраст самого младшего – 0,06 лет (22 дня). Доля взрослых пациентов (старше 18 лет) – 27,4%. Среди пациентов с МВ в РФ незначительно преобладали мужчины и составили – 51,8%, женщины – 48,2%. В течение 2021 г. умерло 46 пациентов МВ (25 мужского пола). Причиной смерти 32 пациентов являлось бронхолегочное поражение [3].

Выделяют несколько основных форм муковисцидоза [10,11]:

- преимущественно легочная (15-20 %) ;
- преимущественно кишечная (5%);

- с поражением желудочно-кишечного тракта и лёгких (75-80%).

Легочная форма является наиболее тяжелой формой МВ. Гиперпродукция вязкого секрета в бронхолегочной системе способствует формированию обструктивного синдрома и присоединению вторичной инфекции. Рецидивирующий хронический инфекционно-воспалительный процесс осложняется гнойно-обструктивным бронхитом, тяжелыми пневмониями, абцессами. К вторичным изменениям относятся бронхоэктазы, пневмосклероз, «легочное сердце». В результате, примерно 70% пациентов с легочной формой МВ умирают от тяжелой дыхательной и сердечной недостаточности [12].

1.2 Микробиологические агенты, осложняющие течение МВ

У детей при МВ часто на первом году жизни в легких создаются условия для размножения микроорганизмов. Защитные механизмы, способные в норме противостоять внешним патогенным агентам у здоровых детей, у детей с МВ оказываются несостоятельными. Накопление вязкого секрета является благоприятной средой для развития хронической инфекции.

Основными возбудителями легочной инфекции у больных МВ являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Колонизация респираторного тракта этими микроорганизмами была связана с повышенным уровнем воспаления в легких, при этом бактерии *P. aeruginosa* были наиболее провоспалительными у детей раннего возраста с муковисцидозом [13]. В 2/3 случаев инфицирование происходит ассоциацией микроорганизмов, причем у госпитализированных больных ассоциации бактерий представлены в 60% случаев более, чем 2 микроорганизмами [14]. Из нижних дыхательных путей больных МВ также выделяют *Burkholderia cepacia complex (BCC)*, *Achromobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae*,

Enterococcus spp., *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* [15].

В 2010 году Шагинян И.А. и коллеги установили предрасположенность к инфицированию конкретными микроорганизмами в зависимости от возраста больных МВ. Установлено, что *S. aureus* выделяется чаще других патогенов у младенцев и маленьких детей с МВ, тогда как высеив *P. aeruginosa* регистрируется чаще у взрослых больных. 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. С возрастом частота выделения *P. aeruginosa* увеличивается, и выделение этих бактерий из образцов мокроты наблюдается примерно у 80% пациентов по их достижению восемнадцатилетия [14].

Исследования, включенные в Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации 2021 года, охватившие 88 регионов РФ, подтверждают данную закономерность спустя 10 лет (после данных, полученных в лаб. МЭГИ Шагиняна И.А.) и демонстрируют как предрасположенность к инфицированию конкретными микроорганизмами изменяется с возрастом (Рисунок 2) [3,14]

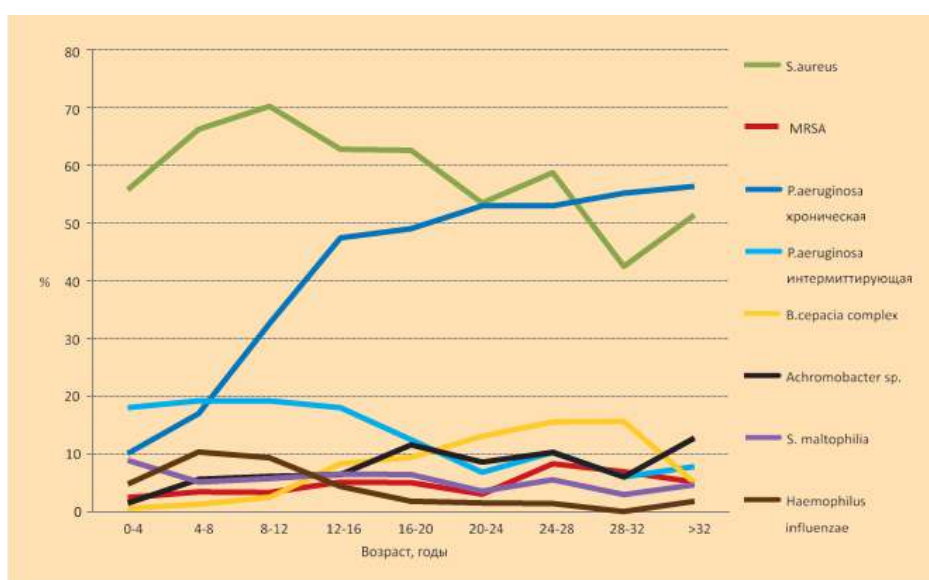


Рисунок 2. Частота выделения микроорганизмов в различных возрастных группах [3]

Наименьшая частота инфицирования *P. aeruginosa* была в возрастных группах 0–4 лет и 4–8 лет, в которых она составила менее 20 и 30% соответственно. И далее идет увеличение роста инфицирования *P. aeruginosa* до возраста больных - 12-16 лет, в которой составляет более 46%. Наибольшая частота инфицирования *P. aeruginosa* наблюдается – в группах 24-28 и старше 32 лет с частотой 63,6% и 62,9% соответственно. Наибольшая частота инфицирования *S. aureus* наблюдается среди пациентов в возрастных группах 8–12 лет и 12–16 лет, где она составила 71,3% и 63% соответственно. *B. ceratia complex* в группе – 24–28 лет с частотой 11,7%, *S. maltophilia* в группах 16–20 лет – 10,5%. Частота *Achromobacter spp.* максимальная у пациентов в группе старше 24-28 лет – 22,1% [3].

Частота хронического инфицирования *P. aeruginosa* дыхательных путей взрослых больных была в 2 раза больше, чем у детей (28.5%) и составила 59.8% (Таблица 1). При возникновении хронической синегнойной инфекции очень трудно элиминировать бактерии *P. aeruginosa* из дыхательных путей МВ. У пациентов с хроническими заболеваниями легких при МВ синегнойная палочка способна сохраняться в дыхательных путях в течение нескольких месяцев или лет [16,17]. Например, Ноiбу описывает 42-летнего пациента с МВ, который получил 114 двухнедельных курсов внутривенных антибиотиков в течение 28 лет, однако в его легких продолжала персистировать *P. aeruginosa* [18].

Наличие бактерий *P. aeruginosa* в легких у больных с МВ часто приводит к смертельному исходу [19,20]. У детей, из мокроты которых в течение года высевалась *P. aeruginosa*, смертность увеличилась в 2,6 раза в последующие 8 лет по сравнению с детьми, у которых синегнойная палочка не высевалась [21]. Кроме снижения выживаемости больных МВ с синегнойной инфекцией, *P. aeruginosa* приводит к снижению показателей функции легких [22].

Таблица 1 - Сравнительная характеристика микрофлоры респираторного тракта детей и взрослых при хроническом инфицировании [3].

Микрофлора	Дети	Взрослые
<i>P. aeruginosa</i> , %	25,4	53,2
<i>S. aureus</i> , %	54,5	50,1
MRSA, %	2,9	3,0
<i>Achromobacter spp.</i> , %	3,6	9,4
<i>B. cepacia complex</i> , %	2,3	9,8
<i>S. maltophilia</i> , %	1,7	0,9
<i>Haemophilus influenzae</i> , %	1,2	0,2
Нетуберкулезные микобактерии, %	0,8	2,0

Таким образом, *P. aeruginosa* занимает второе место среди возбудителей ХИЛ у детей, и первое место у взрослых. Трудность в эрадикации данного возбудителя может приводить к неблагоприятному исходу.

1.3 Микробиологическая характеристика *P. aeruginosa*

1.3.1 Особенности биологии бактерий рода *Pseudomonas*, клиническое значение для человека и особенности геномной структуры *P. aeruginosa*.

Синегнойная палочка широко распространена и встречается повсеместно, что объясняется её возможностью потреблять различные по сложности субстраты и проявлять устойчивость к таким воздействиям, как дефицит питательных веществ, окислительный стресс и воздействие бактерицидных агентов [23].

Естественной средой обитания являются почва и различные пресные и соленые водоемы. Может размножаться в минеральной и негазированной питьевой бутилированной воде, дистиллированной воде, в трубах раковин и на влажных поверхностях. *P. aeruginosa* может присутствовать на продуктах

питания: на фруктах и ягодах (клубника и слива), овощах (томат, редис, сельдерей, морковь и др.), в рыбных продуктах, в замороженном мясе курицы и говядины, яйцах, сыре и пастеризованном молоке [24,25]. Синегнойная палочка в норме колонизирует кишечник у 5-10% здоровых людей и 70% пациентов, находящихся в стационаре [26].

Вид *Pseudomonas aeruginosa* относится к роду *Pseudomonas*. Современная классификация псевдомонад основана на методах молекулярной гибридизации и культуральных особенностях микроорганизмов. Некоторые бактерии рода *Pseudomonas*, например *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas cepacia* сравнительно недавно были отнесены к роду *Burkholderia*. Роды *Pseudomonas* и *Burkholderia* ранее относились к семейству *Pseudomonadaceae*. Но в 1993 году по результатам генетической систематики род *Burkholderia* был отнесен к семейству *Burkholderiaceae*. [26,27].

Наибольшее клиническое значение имеет *Pseudomonas aeruginosa*, которая является возбудителем гнойно-воспалительных заболеваний. Патогенны также *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas stutzeri*.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* способны вызывать широкий спектр инфекционных заболеваний. Синегнойная инфекция может развиваться как с локализованным повреждением органов и тканей, так и как генерализованная инфекция (бактериемия, сепсис). Синегнойная инфекция может поражать практически все органы и ткани. *P. aeruginosa* является одним из самых частых возбудителей острых инфекций, поражающих мочеполовую систему у урологических больных, вызывает гнойные хирургические инфекции, часто встречается у больных с ожогами. Около 40% случаев хронических отитов вызваны синегнойной инфекцией [28,29]. Синегнойная палочка в 16% случаев является причиной развития острого перитонита [30]. Среди синегнойных инфекций мочевыводящей системы чаще встречаются острые нефриты и пиелонефриты, 13% составляют случаи острого простатита [31,32]. У ожоговых больных в составе раневой микрофлоры *P. aeruginosa* является одним из основных

возбудителей инфекции, в общей структуре раневых инфекций занимает 9–10%, причиной гнойных осложнений ожоговых ран в 11,8–30,0% случаев [33,34,35]. Высокая распространенность синегнойной инфекции бронхолегочной системы в отделениях интенсивной терапии связана с искусственной вентиляцией легких - 30% случаев трахеобронхитов и 24% пневмоний [36,37]. Синегнойная палочка является одним из ведущих возбудителей нозокомиальных пневмоний и среди них составляет 24%. По состоянию на 2015 г., в рамках исследования марафон (Склеенова Е. Ю, 2018) *P. aeruginosa* являлась вторым по частоте нозокомиальным патогеном на территории РФ (18,2% от всех нозокомиальных изолятов) [38]. Среди грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* является наиболее распространенной, вызывающей внутрибольничную пневмонию в США, и она часто является госпитальной инфекцией мочевыводящих путей и кровотока [39,40,41]. В исследовании распространенности, проведенном в отделениях интенсивной терапии Западной Европы, *P. aeruginosa* была одним из наиболее распространенных микроорганизмов, составляя почти треть (29%) всех грамотрицательных изолятов [42].

Представители рода *Pseudomonas* – грамотрицательные палочки размером 0,5 - 1,0 × 1,5 - 5,0 мкм, расположенные одиночно, попарно или в виде коротких цепочек. *P. aeruginosa* была открыта А. Люкке в 1862 году, описавшим раневую инфекцию с характерным сине-зелеными окрашиванием повязок, вызванную синегнойной палочкой. С. Жессар выделил бактерии в чистой культуре лишь в 1882 году и назвал *Bacillus pyocynea* (палочка синего гноя). Но позже было показано, что феномен синего гноя связан с образованием сине-зеленого пигмента [43].

Синегнойная палочка подвижна благодаря наличию одного, иногда двух полярно расположенных жгутиков. Спор не образует, имеет пили (фимбрии).

При определенных условиях синегнойная палочка способна продуцировать капсулоподобное слизистое соединение полисахаридной природы – альгинат

полисахарида. Так называемые, мукоидные штаммы, образующие повышенное количество альгината выделяют чаще всего из мокроты больных муковисцидозом.

Геном *P. aeruginosa* представляет собой одиночную хромосому, которая является кольцевой молекулой ДНК. В настоящее время по данным базы геномов бактерий рода секвенировано более 7000 полных геномов *P. aeruginosa* и 14229 полных геномов *Pseudomonas spp.* [44]. Большинство проанализированных штаммов являются изолятами, выделенные из клеток макроорганизмов, и менее десяти из них это изоляты, свободноживущие в природе. Геномная структура синегнойной палочки (содержание G + C 65-67%, размер 5,5-7 Mbp) состоит из одной круговой хромосомы и переменного числа плазмид. Структура основного генома *P. aeruginosa* в значительной степени консервативна и демонстрирует межклональное разнообразие только 0,5-0,7% нуклеотидных последовательностей. Только несколько локусов основного генома подвергаются диверсификации. Разнообразие генома в основном обусловлено наличием дополнительных элементов ДНК, расположенных в 79 областях пластичности генома, расположенных по всему геному.

Впервые полное секвенирование генома бактерии *P. aeruginosa* было выполнено в 2000 году изолята PAO1 [44], выделенного из раны австралийского больного в 1950-х гг. Геном PAO1 состоит из кольцевой хромосомы 6,264 Mbp, кодирующей 5570 предсказанных последовательностей (Рисунок 3). Изолят *P. aeruginosa* PAO1 был и остается основным справочным материалом для генетических и функциональных исследований *P. aeruginosa*.

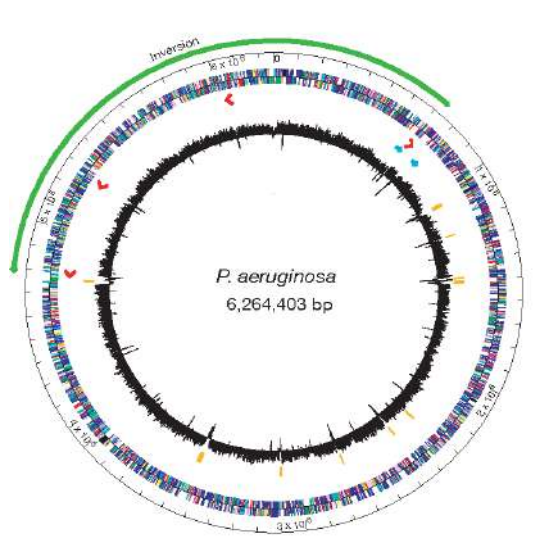


Рисунок 3. Геномная структура *P. aeruginosa* изолята PAO1

Внешний круг показывает размер хромосомы в т.н.п (каждый штрих – 100 т.н.п). Согласно функциональной категории цветными квадратами показано распределение генов. Изображено направление транскрипции (внешняя полоса - плюс цепь; внутренняя полоса - минус цепь). Красные стрелки обозначают начало и направление транскрипции генов рибосомальной РНК; голубые стрелки указывают на местоположение двух областей, содержащих возможный бактериофаг; зелёная стрелка, область инверсии. Проценты содержания G+C показано в центре чёрным кольцевым графиком. Жёлтые столбики указывают области ≥ 3 т.н.п с содержанием G+C ниже среднего по геному [45].

1.3.2 Факторы патогенности бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Источником колонизации *P. aeruginosa* дыхательных путей у больных муковисцидозом может являться окружающая среда. *P. aeruginosa* повсеместно распространена в водоемах, почве и на овощах [46,47]. Многие данные свидетельствуют о том, что большинство людей приобретают синегнойную палочку при контакте с естественными водоемами. Вода имеет важное значение в циркуляции этого микроорганизма. *P. aeruginosa* может выживать в различных растворах, применяемых в медицине (например, жидкость для хранения контактных линз) [48,49,50,51,27]. Кроме того, некоторые пациенты МВ могут приобрести синегнойную инфекцию от других лиц с МВ. Как полагают, сначала

бактерии колонизируют ротоглотку, а затем колонизируют нижние дыхательные пути [51].

В патогенезе синегнойной инфекции участвует целый ряд факторов патогенности этой бактерии. Основными из них являются: факторы адгезии и колонизации; экстрацеллюлярная слизь; токсины и ферменты агрессии (гемолизины, протеазы и нейраминидаза).

У синегнойной палочки были определены два основных бактериальных адгезина: пили IV типа и жгутик [52,53]. Однополярный жгутик представляет собой полимер, состоящий из флагеллина, продукт гена *fliC*. Жгутик (flagella) определяет «плавательную» подвижность бактерий *P. aeruginosa* [54]. Для функционирования пили IV типа необходимо более 40 генов. Пили IV типа являются полярно локализованными отростками, состоящими из полимеров пилина, которые способны обратимо собираться и вытягиваться. Такие движения, позволяющие бактериям перемещаться по твердой поверхности, называют «twitching motility» - «подергивание» [55]. Жгутики и пили IV типа (Tfp) необходимы для адгезии к клеткам, играют важную роль в образовании биопленок *P. aeruginosa* [56,52].

Система секреции 3 типа (secrete type III- SSTT) обеспечивает вирулентные свойства *P. aeruginosa* при острой инфекции, обеспечивая введение токсинов в клетку хозяина. Эта система направляет в клетку-мишень 4 экзофермента: **ExoS** - экзонзим S, **ExoT**- экзонзим T, **ExoU**- фосфолипазу A, и **ExoY** - аденилат циклазу. Смертность пациентов при синегнойной инфекции, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, экспрессирующими по меньшей мере один из экзоферментов системы секреции типа III составила 21% по сравнению с уровнем смертности 3% больных, у которых были выделены штаммы *P. aeruginosa*, не продуцирующие ни один из данных секреторных белков. Экспрессия экзонзимов системы секреции III типа была выявлена у 50% первичных изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом [57,58,59].

При первом положительном высеве из мокроты бактерий *P. aeruginosa* пациенту назначают интенсивную антимикробную терапию, что приводит к улучшению клинической картины и отсутствию высева *P. aeruginosa* у большинства пациентов. Тем временем среди 10-40% пациентов эрадицировать *P. aeruginosa* не удается, что приводит к развитию хронической инфекции [60,61]. Развитие хронической инфекции характеризуется генетической диверсификацией через многочисленные мутации, что приводит к постепенной утрате вирулентности, изменению метаболических свойств, ведущих к появлению различных фенотипов [62,63,64]. После колонизации *P. aeruginosa* верхних дыхательных путей происходит ее генетическая и фенотипическая адаптация, появляются штаммы с мукоидным фенотипом, формируются биопленки, и развивается хроническая синегнойная инфекция [65,66].

Основными факторами патогенности, участвующими в развитии хронической инфекции являются: альгинат, экзотоксин А, сидерофоры, гемолизины.

Альгинат. Альгинат представляет собой экстрацеллюлярную слизь, которая в отличие от капсулы не имеет четких границ и легко выделяется во внешнюю среду. Гликолипопротеид, входящий в состав альгината *P. aeruginosa*, также принимает участие в процессе адгезии на эпителии дыхательных путей. Это капсулоподобное вещество обладает антигенными и токсическими свойствами, защищает бактерии от фагоцитоза и обезвоживания, вызывает лейкопению. Переход немуконидного фенотипа в мукоидный происходит в результате мутации гена *mucA*. Мукоидный фенотип *P. aeruginosa* является маркером хронической инфекции при муковисцидозе. Исследование тканей пациентов с МВ, умерших от хронической синегнойной инфекции показало присутствие бактерий *P. aeruginosa* с мукоидным фенотипом [67]. Мутации в гене *mucA* были обнаружены в 92% мукоидных и 70% немуконидных изолятах *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов МВ с хронической синегнойной инфекцией. Можно предположить, что

большинство немуккоидных изолятов являются ревертантами [68]. Известно 24 гена, участвующих в продукции альгината *P. aeruginosa*. [69,70].

Экзотоксин А (ETA) является одним из значимых факторов патогенности *P. aeruginosa* [71]. Экзотоксин А является цитотоксином, который вызывает глубокие нарушения клеточного метаболизма в результате подавления синтеза белка в клетках и тканях. Он является АДФ-рибозилтрансферазой и подобен дифтерийному токсину. Белок ETA 68 кДа, кодируемый геном *toxA*, необратимо ингибирует синтез белка в эукариотических клетках, тем самым вызывая их гибель [72,73]. Доказано, что он также подавляет синтез иммуноглобулинов, вызывает нейтропению. Экзотоксин А обладает высокой летальностью при введении его в очищенном виде животным [74]. Экзотоксин А продуцируется в неактивной форме и активируется при участии различных ферментов внутри организма. Регулирование продукции ETA является сложным процессом, который включает в себя факторы окружающей среды и целый ряд регуляторов [72]. 86% клинических штаммов и 27% штаммов синегнойной палочки, выделенных из окружающей среды, продуцируют экзотоксин А [75,76].

Гемолизины. Синегнойная палочка продуцирует два гемолизина: термостабильный гликолипид (рамнолипид) и термолабильный гемолизин, известный как гемолитическая фосфолипаза С (PLC). *P. aeruginosa* вырабатывает две гомологичные внеклеточные фосфолипазы, гемолитическую PlcH и негемолитическую PlcN. PlcH и PlcN идентичны на 40% на уровне аминокислот. [77,78]. Ингибирование гемолитической фосфолипазы С защищает функцию легких во время синегнойной инфекции. [79,80].

Рамнолипид является биосурфактантом и обладает поверхностно-активными свойствами. Рамнолипид способен растворять фосфолипиды легочных тканей, которые являются субстратами для фосфолипазы С [81]. Регулирование образования внеклеточного рамнолипида происходит на генетическом уровне генами *rhlR* и *rhlI* и зависит от определенных факторов окружающей среды, к ним относятся рН, температура, концентрация микроорганизмов. *P.*

aeruginosa способна синтезировать большое количество рамнолипида в условиях ограничения в среде Fe, Mg, Ca, K, Na и микроэлементов. [82,83,84].

Сидерофоры. Железо имеет решающее значение для роста любого организма, и *P. aeruginosa* не является исключением. В легочных альвеолах больных МВ в слое слизи наличие железа ограничено и количество кислорода уменьшается, образуя гипоксический градиент, который колеблется от $\leq 10\%$ содержания кислорода, что близко к анаэробным условиям [85,86]. Синегнойная палочка, являясь облигатным аэробом, выживает в данных условиях с низким содержанием кислорода в мокроте легких больных МВ благодаря использованию нитрата в поверхностном слое дыхательных путей в качестве альтернативного акцептора электронов. Достаточные уровни нитрата в слое слизи способствуют благоприятному росту *P. aeruginosa*, что приводит к хронической колонизации [85,87].

Синегнойная палочка продуцирует два сидерофора: пиовердин и пиохилин [88]. Пиовердин *P. aeruginosa* способствует формированию хронической инфекции в легких больных с МВ [89]. Регулятор поглощения железа Fur (ferric uptake regulator) синегнойной палочки представляет собой белок, являющимся одним из основных регуляторов механизмов захвата железа [90].

Контроль за транскрипцией генов осуществляется системой кворум сенсинг (Quorum sensing) и имеет решающее значение для эффективного функционирования клеток бактерий и позволяет экономить ресурсы бактерий. Quorum sensing (QS) – «чувство кворума» представляет собой глобальную систему регулирования, которая контролирует экспрессию многочисленных генов и фенотипов, приводящих к приспособлению к условиям окружающей среды и воздействию факторов стресса. QS регулирует продукцию, секрецию факторов патогенности бактерий, реагируя на сигнальные молекулы, которые известны как аутоиндукторы. Когда сигнальные молекулы достигают пороговой концентрации, они связываются с конкретными рецепторными белками, которые затем инициируют транскрипцию QS-контролируемых генов. Таким образом, большая

часть бактериальной популяции способна одновременно экспрессировать специфический фенотип. Исследования микрочипов ДНК показали, что QS контролирует экспрессию до 10% генома синегнойной палочки; многие из этих генов вносят свой вклад в сохранении микроорганизма во время инфекции. QS участвует в основном в регуляции вирулентности, передачи конъюгативных плазмид, споруляции, образования биопленки, антимикробного пептидного синтеза, и симбиоза [91,92,93].

1.3.3 Формирование биопленок *P. aeruginosa* при хронической инфекции легких у больных МВ.

В развитии хронической инфекции легких у пациентов при муковисцидозе ведущую роль играют биопленки, образованные штаммами мукоидного фенотипа *P. aeruginosa*, которые могут состоять из ассоциаций различных микроорганизмов.

Биопленки представляют собой структурированное сообщество бактерий, состоящее как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся форм, заключенных в полимерную матрицу.

История изучения и наблюдения биопленок начинается с 17 века, когда А. Левенгук рассматривал в микроскоп налет на зубах. В 1933 Артур Хенричи написал: "вполне очевидно, что в воде большая часть бактерий не свободно плавает, а растёт на подводных поверхностях, они «бентос», а не «планктон»". [94]. В 1943 году Клод Зобелл сообщил о своих опытах в стеклянной бутылке. Он наблюдал, как бактерии, внесенные в бутылку, исчезают из жидкой фазы. Одновременно происходило быстрое увеличение количества бактерий, прикрепленных к поверхности бутылки. Зобелл пришел к выводу, что бактерии

прикрепились к поверхности стекла, поэтому концентрация их на стекле стала значительно выше, чем в объеме жидкости [95].

В последующие десятилетия изучение микробных биопленок продолжилось. В 1977 г. бактерии синегнойной палочки были найдены в мокроте у пациентов, страдающих муковисцидозом, и это стало отправной точкой, когда ученые начали понимать, что биопленки бактерии имеют непосредственное отношение к патогенезу заболеванию [96, 97]. Б. Костертоном в 1978 году был предложен термин «биопленки» и определены стадии образования биопленок [98]. Образование биоплёнок – это сложный динамический процесс. Выделяют пять последовательных этапов образования биопленок:

1. Адгезия. Обратимое прикрепление к поверхности микроорганизмов, существующих в виде свободно плавающих масс или единичных (планктонных) колоний.
2. Фиксация бактерий. Необратимое окончательное прикрепление бактерий за счет выделяемого ими полимерного матрикса.
3. Созревание биопленки. Клетки, осуществившие прикрепление к поверхности, обеспечивают адгезию последующих клеток. Формирование слизистого защитного матрикса, удерживающего вместе все колонии.
4. Рост биопленки. Образование зрелой биопленки, которая изменяет свой размер и форму. Внеклеточный матрикс служит защитой клеток от внешних воздействий.
5. Дисперсия (от лат. *dispersio* – рассеяние) - в результате периодического деления от биопленки отрываются отдельные клетки, способные через некоторое время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию [99].

Основным компонентом матрицы биопленки являются экзополисахариды. Консорциум бактерий встроен в матрицу синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ. В легких больных муковисцидозом большей частью матрицы биопленки синегнойной палочки является полисахарид альгинат. Матрица также содержит белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества.

Матрица защищает бактерии *P. aeruginosa* в биопленке от антибактериальных препаратов, а также от различных воздействий внешней среды (рН среды, фагоцитоза, факторов иммунной защиты организма) [100,101,102]. Биопленки содержат популяции персистирующих бактериальных клеток, которые характеризуются медленным ростом благодаря появлению карликовых колоний SCV-фенотипа с высокой устойчивостью к воздействию внешних факторов. Многие антибиотики менее эффективны против клеток, характеризующихся медленным ростом или не растущих. Бактерии внутри биопленок способны проявлять более высокую (до 100-1000 раз) устойчивость к антибиотикам, к дезинфицирующим средствам (в 150-3000 раз) по сравнению с планктонными клетками [103, 104].

Процесс формирования биопленок бактерий регулируется системой QS. Работа QS регуляции дает возможность бактериям скоординировано контролировать экспрессию генов во всей популяции. В подобном поведении бактерий проявляются черты сходства с многоклеточными организмами [101,102].

Рост биопленок *P. aeruginosa* может свидетельствовать о развитии хронической инфекции у больных муковисцидозом. Хроническое воспаление является основной причиной повреждения легочной ткани при МВ. Исследование Т. Бьярнсхольта тканей легких больных МВ умерших от хронической синегнойной инфекции, показало, что *P. aeruginosa* обитает там преимущественно в составе биопленок. [105]. Биопленки в хронически инфицированных легких больных также способны выступать в качестве бактериального резервуара, из которого планктонные клетки могут распространяться и колонизироваться на новых участках и, таким образом, вызывая воспалительные реакции и клинические симптомы.

1.4 Эпидемиологическое значение резистентных штаммов *P. aeruginosa* к антимикробным препаратам

Хроническая инфекция легких, вызванная *P. aeruginosa* представляет собой серьезную опасность для больных МВ. Трудности антимикробной терапии больных МВ с синегнойной хронической инфекцией обусловлены как природой этой инфекции, так и ограниченным числом антибиотиков, к которым этот возбудитель чувствителен. Американское общество по инфекционным болезням составило список патогенных микроорганизмов «ESKAPE», представляющих наибольшую угрозу для здоровья населения вследствие сочетания возрастающей распространенности и неэффективности существующих антибактериальных агентов [106]. Синегнойная палочка является одной из шести бактерий, которые были включены в список «ESKAPE» наряду с *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, и представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Природная резистентность *P. aeruginosa* может быть связана с 2 факторами: 1) продукцией хромосомной цефалоспориназы (AmpC), 2) экспрессией фосфотрансферазы. Синегнойная палочка имеет природную резистентность ко многим антибиотикам: тетрациклинам, аминопенициллинам, большинству цефалоспоринов (исключение цефепим, цефтазидим), фузидиевой кислоте, линезолиду, макролидам. В отношении *P. aeruginosa* активны следующие группы антибиотиков: полимиксины (полимиксин В, колистин) и фосфомицин, аминогликозиды (гентамицин, тобрамицин, амикацин, нетилмицин), карбапенемы (имипенем, меропенем, дорипенем), цефалоспорины (цефтазидим, цефепим, цефтолозан/тазобактам), фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин), ингибиторозащищенные антисинегнойные пенициллины (пиперациллин/тазобактам, тикарциллин/клавуланат), монобактамы (азтреонам). [107].

Приобретение устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* является серьезной проблемой во всем мире: США, Европе, Индии, Саудавской Аравии, Японии [106,107,108,109,110, 111, 112]. В РФ в рамках исследования МАРАФОН [112] частота резистентности госпитальных штаммов *P. aeruginosa* к антимикробным препаратам была к колистину – 2,2%, к азтреонаму – 37.5%, к амикацину – 45,2%. 56.8% изолятов *P. aeruginosa* были устойчивы к пиперациллину/тазобактаму. К антисинегнойным цефалоспорином: цефепиму резистентность проявили 50,2% изолятов *P. aeruginosa*, к цефтазидиму - 56,8%. В последнее время происходит увеличение резистентности *P. aeruginosa* в том числе и к карбапенемам: имипенему – 51,5%, меропенему – 53,3% [112].

Устойчивость синегнойной палочки к этой группе антибиотиков может быть обусловлена нарушением транспорта препарата внутрь клетки в результате мутаций, ведущих к потере карбапенем-специфического мембранного порина *OprD*, что нередко сочетается с гиперпродукцией *AmpC* и гиперэкспрессией механизмов активного выведения – эффлюксной системой (например, *texAB-oprM*) [113]. Однако наибольший вклад в развитии резистентности к бета-(β)-лактамным антибиотикам играют ферменты бета-лактамазы, среди которых металло-β-лактамазы, относящиеся к молекулярному классу В. Впервые металло-β-лактамазы (МβL) были зарегистрированы в Японии в 1988 году [114]. Эти ферменты содержат один или два атома Zn в активном центре. Они гидролизуют все бета-лактамы, включая карбапенемы, кроме азтреонама. Наиболее распространенные МβL включают ферменты VIM, IMP, GIM, SPM, SIM и недавно идентифицированный NDM-1. В частности, *bla* VIM-2 стал доминирующим вариантом МβL во всем мире [115,116]. Главное значение в усилении резистентности имеет тот факт, что продуцирующие МβL гены входят в состав интегронов, которые легко встраиваются в плазмиды и транспозоны. Обмен мобильными генетическими элементами внутри популяции одного вида, а также между различными видами бактерий приводит к быстрому распространению резистентных штаммов [117].

Многоцентровые исследования в РФ 1997-2015 антибиотикорезистентности синегнойной ВБИ показали, что 96% штаммов *P. aeruginosa* были устойчивы к карбапенемам за счет продукции металло- β -лактамаз VIM типа, тогда как продуценты карбапенемаз других групп встречались реже: GES-5-подобные – 3,0%, IMP – 0,5%. BLA (VIM-2) гены были обнаружены в 707 (99,6%) из 710 MBL-положительных штаммов. Самой эффективной группой препаратов являлись полимиксины (колистин и полимиксин В), устойчивость к которой при ВБИ в РФ составила менее 10%. Анализ результатов MLST-типирования популяции *P. aeruginosa* в России показал достаточно ограниченное разнообразие генотипов карбапенемазопродуцирующих штаммов, которые относились к следующим сиквенс-типам ST 235, ST 654, ST 111, ST 244, ST 313. Металло- β -лактамазы VIM-типа выявляли у изолятов *P. aeruginosa* разных генотипов, тогда как GES-5-подобные карбапенемазы выделены только у ST 235 [112, 118].

Устойчивость *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам

В борьбе с инфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, возникают объективные трудности в виду особых свойств бактерии. *P. aeruginosa* обладает высокой адаптационной способностью, размножается в условиях полного отсутствия органических веществ, не теряет жизнеспособность в целом ряде дезинфицирующих растворов [119]. Синегнойная палочка, основным местом обитания которой является внешняя среда, способна длительно сохранять жизнеспособность на предметах медицинского назначения: перевязочном материале (марле) - до 60 суток, металлических инструментах - до 12 суток, деталях системы переливания крови - до 6 суток. Развивается даже в дистиллированной воде, сохраняется в которой до 130 суток, в нестерильной воде - до 60 суток [120]. Для уничтожения микроорганизмов во внешней среде применяют дезинфектанты. Дезинфектанты используются в рабочих концентрациях, которые должны убивать вегетативные формы бактерий при

определенной экспозиции. Все дезинфектанты можно разделить на 9 классов [121]:

- *галоидсодержащие* – это средства, имеющие в своем составе в качестве активно действующего вещества хлор, бром, йод.
- *кислородсодержащие соединения*. Это группа препаратов, действующим веществом которых является кислород в составе перекиси водорода, перекисных соединений, надкислот.
- *поверхностно-активные вещества (ПАВ)* – группа препаратов, в которой к дезинфектантам относятся амфотерные поверхностно-активные соединения и средства на основе четвертично-аммониевых соединений. При длительном применении препаратов группы ПАВ, к ним может выработаться устойчивость микроорганизмов. Бактерицидное действие против грамположительных бактерий и грибов проявляется в разведении до 1:200 000, грамотрицательных — до 1:30 000; для уничтожения *Pseudomonas aeruginosa* требуется более 1:30 000.
- *гуанидины* – группа препаратов, действующим началом которых являются сложные органические соединения такие, как хлорфенилгуанидиногексан.
- *альдегидсодержащие средства* – группа препаратов, на основе глутарового или янтарного альдегида.
- *спирты* – это группа препаратов, на основе этанола, пропанола, изопропанола.
- *фенолсодержащие средства* – в настоящее время используются только синтетические фенолы, т.к. дезинфектанты на основе карболовой кислоты ограничены для применения из-за высокой токсичности и стойкого запаха. Производные бисфенолов — гексахлорофен, триклозан используют в медицинских мылах и моющих пастах. Они обладают бактериостатическим действием, но слабо действуют на бактерии рода *Pseudomonas spp.*
- *кислоты и щелочи*. Используются средства только на основе органических кислот, которые в растворе диссоциируют не полностью. Антимикробной активностью обладает кислота в недиссоциированной форме.
- *Тяжелые металлы*. Применяются препараты, которые содержат серебро и ртуть.

Факторами, определяющими выбор дезинфицирующего средства, являются химические свойства его состава и характер микроорганизма. Основные свойства различных групп активных веществ в отношении микроорганизмов представлены в таблице 2. В сравнении с грамположительными бактериями грамотрицательные более устойчивы. *Pseudomonas aeruginosa* особенно устойчивы благодаря присутствию во внешней мембране липида А, обеспечивающего защиту от проникновения многих химических веществ.

Таблица 2 – Основные свойства различных групп активных веществ в отношении микроорганизмов [121].

Свойства	Спирты	Альдегиды	Фенолы	Кислород- содержащие	ЧАС (ПАВ)	Гуани- дины	Галоид- содержащие
Запах	А	А	А	А	В	В	А
Токсичность	Г	Б	А	Б	Г	Г	В
Взаимодействие с материалами и антикоррозийная активность	В	В	А	А	Г	Г	В
Стабильность	В	Б	Б	Г	Б	Б	Г
Моющий эффект	Г	Г	Г	В	А	А	В
Экологическая безопасность	Г	В	А	Б	Г	Г	В

Примечания: (А) — очень выражено; (Б) — умеренно выражено; (В) — слабо выражено; (Г) — отсутствует.

По данным систематического обзора публикаций оригинальных исследований, посвященных устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к дезинфектантам [122], в течение последних 50 лет наибольший интерес ученых представляли следующие дезинфицирующие средства: гуанидины, ЧАС (бензалконий хлорид), перуксусная кислота, формальдегид. Устойчивость

клинических изолятов *P. aeruginosa* (n=178) к двум различным дезинфектантам была изучена в Японии [123]. Изоляты были чувствительными к хлоргексидину (МИК составила 78–625 микроорганизмов/мл. К хлориду бензалкония были чувствительными 84,3% культур *P. aeruginosa* (150/178) при МИК 625 КОЕ/мл. По данным исследователей резистентность *P. aeruginosa* к хлориду бензалконию может приобретаться в эксперименте, хотя и не на высоком уровне. Устойчивость *P. aeruginosa* к хлориду бензалкония была также показана и у A. Bridier с соавт. [124].

Резистентные культуры *P. aeruginosa* к дезинфицирующим растворам, используемых в контейнерах для хранения контактных линз, были обнаружены по данным работы С. Lakkis с соавт. [125]. Клинические изоляты *P. aeruginosa* (n=35) отличались своей чувствительностью к ним. МИК для полиаминопропилбигуанида (0,00005%) и поликва-терния-1 (0,001%) составляли от 6,25 до 100% при температуре 37°C. Несколько изолятов продолжали расти и при концентрации дезинфицирующего раствора – 100% при комнатной температуре.

Ввиду вышесказанного важную роль играет мониторинг синегнойной инфекции у больных МВ и, как его составная часть, контроль чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам для назначения адекватной терапии, а также дезинфицирующим средствам с целью предупреждения распространения в лечебных учреждениях инфекционных заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*.

1.5 Идентификация бактерий *P. aeruginosa*

Бактерии рода *Pseudomonas* являются облигатными аэробами и хорошо растут на питательных средах и способны в течение нескольких месяцев выживать и размножаться даже в присутствии следовых количеств питательных веществ во влажных средах [126].

На твердых питательных средах *P. aeruginosa* продуцирует триметилаламин,

придающий своеобразный сладковатый запах жасмина или земляничного мыла. Чаще всего продуцируют пигменты сине-зеленого цвета пиоцианин и зеленый флюоресцирующий в УФ-лучах пиовердин. Реже встречаются пигменты – α -оксифеназин (желтый), пиорубин (красный) и черный (пиомеланин) [119].

Для выделения *P. aeruginosa* используют обычно лабораторные среды, такие как агар с бараньей кровью или шоколадный агар. Такие среды могут быть использованы для выделения *P. aeruginosa* из клинических проб, когда менее вероятным является выделение смешанной флоры. Однако этот микроорганизм довольно часто в патологическом материале находится в ассоциации с другими микроорганизмами, поэтому для выделения чистой культуры синегнойной палочки применяют дифференциально-диагностические среды: агар МакКонки, Эндо агар, агар ЦПХ (N-цетилпиридиний хлористый), среды на основе цетримиды и ацетамида, а также лабораторные среды с добавлением антисептиков – малахитовый агар с добавлением бриллиантового зеленого [127, 128].

На основании многолетнего опыта лаборатории МЭГИ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи был разработан алгоритм микробиологической диагностики хронической легочной инфекции у больных МВ [127], основанный на применении комплекса бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. А также была предложена система в виде ПЦР-панели, с помощью которой возможно проведение мультиплексной ПЦР для идентификации бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus*, *Bcc*, *Achromobacter spp.* [129,130].

P. aeruginosa способна расти при 42°C, что является ее отличительным свойством от других псевдомонад. Идентификация *P. aeruginosa* может быть подтверждена на основе положительного теста на оксидазу. Большинство изолятов *P. aeruginosa* типичного фенотипа легко распознаются на питательной среде на основе морфологических характеристик колоний и типичного пигментообразования. Однако из образцов мокроты респираторного тракта больных муковисцидозом могут быть выделены изоляты *P. aeruginosa* атипичного

фенотипа. Для постановки правильного диагноза и назначения эффективной терапии больному необходимо детально разработать алгоритм идентификации *Pseudomonas aeruginosa* атипичного фенотипа для его использования при эпидемиологическом надзоре и контроле этой инфекции.

1.6 Молекулярная эпидемиология хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*, у пациентов с МВ

Молекулярная эпидемиология использует методы молекулярной биологии для решения эпидемиологических задач. Применение методов молекулярной биологии оказало большое влияние на развитие эпидемиологии. Такие методы, как типирование ДНК возбудителей инфекционных болезней, позволяют определять точные генотипы микроорганизмов и их источники, отслеживать пути передачи, изучать популяционную динамику штаммов различных возбудителей и определять эпидемически значимые штаммы. В 1998 году был предложен метод типирования бактерий, разработанный М. С. J. Maiden и соавторами, основанный на мультилокусном секвенировании (Multilocus Sequence Typing - MLST) [132]. При данном методе секвенируется определенный набор генов «домашнего хозяйства» (обычно 6-7 генов), отвечающих за внутриклеточный метаболизм. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» (или «сиквенс-типом») по выбранным локусам.

В настоящее время в Базе данных Pub MLST представлено данные 9655 изолятов *P. aeruginosa*, принадлежащим к 4842 сиквенс - типам (ST) *P. aeruginosa* [133]. Наибольшее распространение в мире получил штамм *P. aeruginosa* ST 235 (413 изолятов). География обнаружения данного сиквенс-типа различна. Так, во Франции определение генетического разнообразия штаммов синегнойной

палочки, выделенных от больных при госпитальных инфекциях в различных французских больницах выявило, что большинство изолятов относятся к ST 235, а также к ST111 и ST175 [134]. 205 штаммов *P. aeruginosa* были собраны из 18 университетских больниц в Корее. Наиболее распространенный тип последовательности был ST235 [135]. В России исследование штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих в ФНЦТИО им. ак. В. И. Шумакова показало, что ведущим генотипом является ST 235, менее распространены были ST 446, ST 598 и ST 966 [136]. В результате исследования популяции *P. aeruginosa* двух московских педиатрических стационаров в 2012-2016 гг. было выявлено, что наибольшее распространение имели 5 сиквенс типов: ST235, ST446, ST111, ST654 и ST2592 [137]. Многоцентровые исследования нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий в 1998-2010 показало циркуляцию *P. aeruginosa* ST235 в России. Распространение данного сиквенс-типа было выявлено также на территории нескольких городов Беларуси и Казахстана [138]. Типирование 180 карбапенемазопродуцирующих изолятов *P. aeruginosa* в России в 2015 году выявило, что среди них преобладали ST235 (74,4%) и ST 654 (22,8%), кроме того были выявлены ST 111 (1,6%), ST 244 (0,6%), ST 313 (0,6%) [112].

Однако в Китае в ходе анализа методом MLST 368 штаммов синегнойной палочки, выделенных в период с января 2010 года и мае 2012 года, было выявлено 138 сиквенс-типов, в том числе 122 известных и 16 новые ST, и чаще обнаруживался клон ST244, чем ST235 [139]. В Бразилии в 11 городах широко распространены были различные сиквенс-типы *P. aeruginosa*: ST 277, ST 593, ST594 и ST595 [140]. В 16 испанских больницах были выделены 39 сиквенс-типов *P. aeruginosa*, наиболее часто встречающимися оказались: ST 175, ST 111, ST 646, ST 532. В ходе исследования изолятов *P. aeruginosa*, полученных в течение 2 лет от больных ожогового отделения города Урмия в Иране, было установлено 12 различных генотипов, и доминирующий среди них ST 773 [141].

Данные о сиквенс-типах синегнойной палочки, выделенных от больных МВ впервые были получены в 1996 году в Ливерпуле. У пациентов с МВ был

зарегистрирован эпидемический клон *P. aeruginosa* ST 146, так называемый ливерпульский эпидемический клон (LES). Дальнейшие исследования показали распространение перекрестной инфекции LES между пациентами МВ, находящихся в 15 центрах муковисцидоза в Англии. Позже было установлено распространение в клиниках МВ в Манчестере мультирезистентного штамма *P. aeruginosa*, соответствующего ST 148, получившего название манчестерский эпидемический штамм (MES) [139,142,143,144].

Учеными из Австралии установлено, что в штате Квинсленд примерно у 60% пациентов МВ с синегнойной инфекцией бактерии данного вида относятся к одному из трех доминирующих сиквенс-типов: ST 649 (AUST-01) и ST 775 (AUST-02), ST 801 (AUST-06). Генотипы AUST-01 и AUST-02 распространены по всей Австралии в клиниках МВ, в то время как третий, ST 801 (AUST-06), ограничивается в основном для пациентов с МВ в Квинсленде [145]. В Нидерландах в 2007 и 2008 годах в двух крупных медицинских центрах МВ было изучено генетическое родство изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, которые составляют 45% от общего числа больных муковисцидозом. Были определены 142 различных сиквенс-типа, из которых 43 были у 2 или более пациентов. Доминирующими сиквенс-типами были ST 406 и ST 497. Несмотря на то, что у 51% пациентов одновременно колонизировали два или более фенотипически различных изолятов, различными по сиквенс-типу были обнаружены лишь у 11% больных [146].

Мультилокусное секвенирование штаммов выделенных от 102 больных центра МВ Онтарио (Канада) показало, что наибольшее распространение получил штамм ST 146 (LES), выявленный у 15% больных. У 4% пациентов выделяли изоляты *P. aeruginosa* генотипа ST 439. Большинство пациентов были инфицированы уникальными штаммами, ранее не описанных сиквенс-типов. Уровень ухудшения статуса (трансплантация легких или смерть) был выше среди больных, инфицированных штаммом LES (18,6%) по сравнению с инфицированными уникальными штаммами (8,7%) [147].

На 27 января 2022 года в базу PubMlst [133] внесены данные 411 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом различных сиквенс-типов из Австрии, Армении, Австралии, Великобритании, Венгрии, Испании, Италии, Казахстана, Нидерландов, России, Франции, Южной Африки. 21 различных сиквенс-тип *P. aeruginosa* выделены в России, наиболее часто встречались ST 274, ST 794 и ST 1058 (Рисунок 4).

Наибольшее количество ST *P. aeruginosa* было определено в Испании и Австралии, и составило 64 и 136 сиквенс-типа соответственно.

Практически все сиквенс-типы (243/248, 98 %) *P. aeruginosa* встречались только на территории своей страны. 5 клональных комплексов *P. aeruginosa*, ST 235, ST 155, ST 146, ST 274 и ST 794 встречались и в других странах (были международными). ST 235 был выявлен у больных МВ в трех странах: в 2006 году в Австралии, в 2017 г. в Казахстане и России. ST 146 был определен в 2007 году в Испании и в Австралии. ST 274 был типирован в Австралии 2007-2009 гг, в Испании в 2003, 2009 гг. и в России в 2018, 2019 годах. В 2008 году в Австралии и в 2017, 2018 гг. в России выделяли *P. aeruginosa* ST 794. ST 155 был выявлен в 2007 году в Испании, в 2007-2009 гг в Австралии и в 2017 году в России.

Генетическое разнообразие изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ Испании и Австралии, свидетельствует о том, что источники *P. aeruginosa* могли быть разными и синегнойная инфекции у пациентов МВ вероятно была вызвана штаммами из окружающей среды. Циркуляция клонов *P. aeruginosa* ST274, ST 649 и ST 775 в Австралии указывает на их госпитальное происхождение.

Представленных данных о распространении сиквенс типах *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ в России недостаточно и для организации надлежащего инфекционного контроля для профилактики распространения эпидемических штаммов *P. aeruginosa* среди больных МВ необходимо определять являются ли штаммы, выделенные от разных больных, изолятами одной генетической линии и исследовать методом MLST.

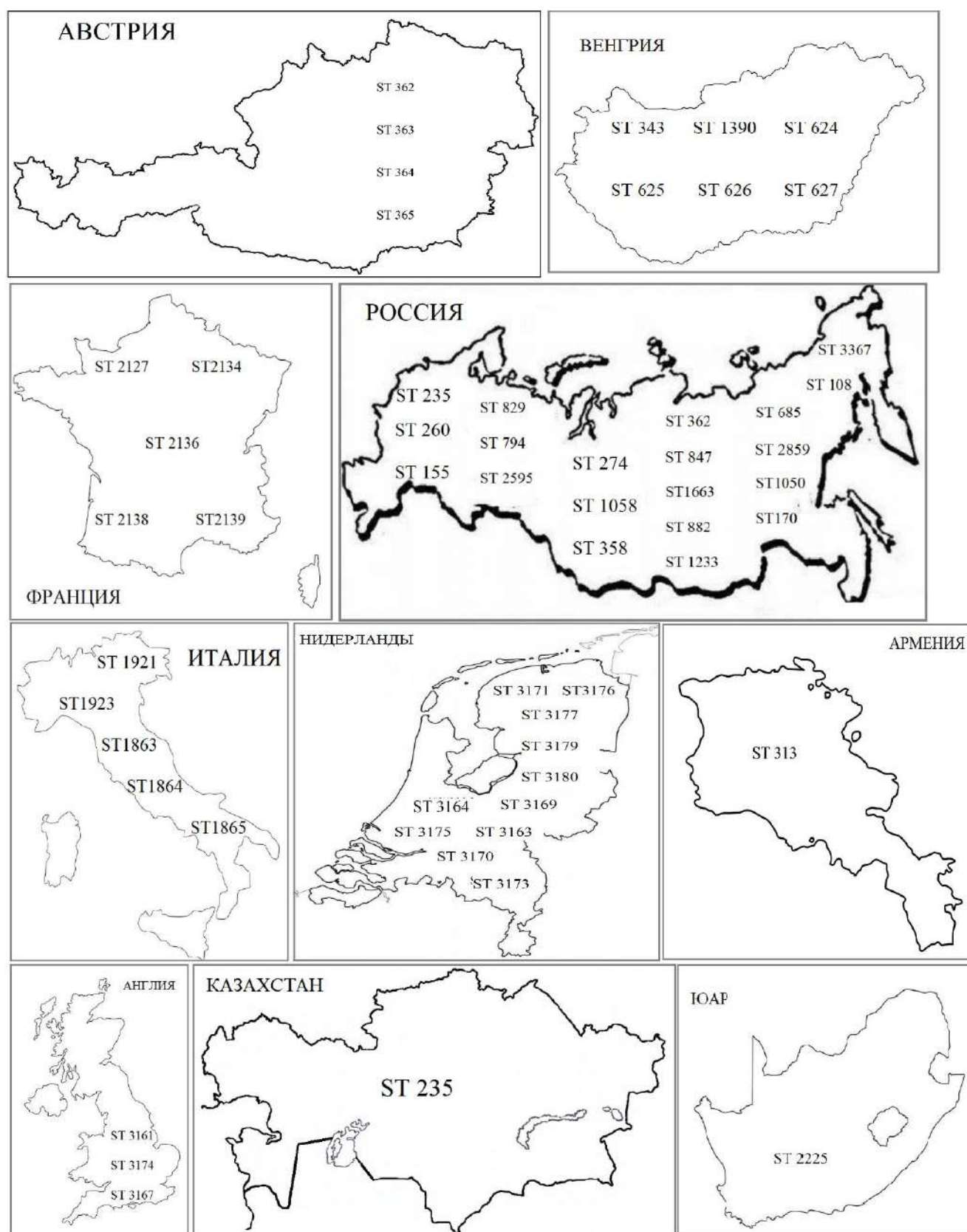


Рисунок 4. Сиквенс-типы *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ в различных странах.

1.7 Заключение

Таким образом, анализ приведенных данных литературы показывает, что хроническая инфекция легких, вызванная *P. aeruginosa*, остается одной из основной причин инвалидизации и уменьшении продолжительности жизни больных МВ. Это подчеркивает важность своевременной и правильной диагностики хронической инфекции легких, вызванной бактериями *P. aeruginosa*. При лечении хронической инфекции очень трудно элиминировать бактерии *P. aeruginosa* из дыхательных путей у больных с МВ. Кроме того, сложность лечения больных связана с тем, что для здравоохранения МВ является дорогостоящим заболеванием. Стоимость лечения пациентов с МВ существенно увеличивается при инфицировании нижних дыхательных путей больных МВ бактериями *P. aeruginosa* и в большей степени при установлении ее хронической формы и составляет 2 666 281,5 рублей в год [148].

Из этого следует необходимость постоянного микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у пациентов с МВ.

В литературе широко представлены данные о распространении сиквенс-типов *P. aeruginosa*, выделенной при различных инфекциях, однако данных о изолятах *P. aeruginosa*, выделенных у пациентов с муковисцидозом от больных МВ гораздо меньше, а в России недостаточно. Имеются данные о случаях внутрибольничных вспышках вспышек инфекции, вызванных эпидемически значимыми штаммами *P. aeruginosa*, в центрах муковисцидоза различных стран. Сведения о вспышках, вызванных *P. aeruginosa* в российских центрах, отсутствуют.

Эпидемиологические исследования, посвященные домашней среде больных МВ, были проведены главным образом в зарубежных странах [149,150,151]. В РФ такие исследования единичные. Так, российские исследователи проводили оценку

влияния микрофлоры объектов окружающей среды на возможность колонизации дыхательных путей пациентов с МВ г. Самары. Были выделены неферментирующие грамотрицательные бактерии, имеющие клиническое значение при муковисцидозе, в т.ч. *Achromobacter spp.*, *Ralstonia spp.*, *Pandorae spp.* Бактерии *P. aeruginosa* не высевали [152]. Таким образом, эти данные не позволяют оценить роль окружающей домашней среды детей с муковисцидозом как резервуара бактерий *P. aeruginosa*.

В литературе отсутствуют данные чувствительности к дезинфектантам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных у пациентов с муковисцидозом на территории РФ.

В связи с вышесказанным необходимо усовершенствовать алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*, разработать схему микробиологического мониторинга и изучить основные эпидемиологические характеристики этой инфекции, чему и посвящено настоящее исследование.

Глава 2. Собственные исследования

2.1 Материалы исследования

С 2005 по 2022 гг. проведён микробиологический мониторинг микрофлоры нижних дыхательных путей у больных с МВ в постоянном сотрудничестве с коллегами из Центра Муковисцидоза (МГНЦ им. Н. П. Бочкова) профессором Н.И. Капрановым, профессором д.м.н. Е.И. Кондратьевой и к.м.н. А. Ю. Воронковой, а также к.м.н. С.А. Красовским (ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России). Всего исследовано 3900 образцов биологического материала (мокроты, мазков из зева, бронхоальвеолярного лаважа): 3601 проба от детей и 299 от взрослых пациентов с МВ. Образцы были получены из ФГБУ «РДКБ» МЗ РФ, ФГБУ МГНЦ РАМН, ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, в Самарской детской больнице, отделении пульмонологии детской больницы Святой Ольги (Санкт-Петербург) Медицинских Центров муковисцидоза Краснодарского края, Ростовской, Калужской, Тверской, Белгородской, Брянской, Липецкой, Томской, Челябинской, Якутской, Архангельской, Калининградской областей, и наблюдавшихся амбулаторно в Российском центре муковисцидоза из различных регионов Российской Федерации. В контрольную группу вошли 90 пациентов, не страдающих МВ: 24 пациента, проходившие лечение в «ГКБ им В.М. Буянова ДЗМ», и 66 амбулаторных пациентов. Изоляты *P. aeruginosa* были выделены из зева, уха, мочи, хирургических ран взрослых больных при острой синегнойной инфекции.

Собрана коллекция 402 штаммов *P. aeruginosa*.

В исследовательской работе для изучения бактериологических посевов, выделения, идентификации микроорганизмов и изучения фенотипических свойств *P. aeruginosa* были использованы общепринятые бактериологические и биохимические методы, а также алгоритм микробиологической диагностики

мокроты, разработанный сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» [127]. В качестве материала для бактериологических посевов служили мокрота или бронхоальвеолярный лаваж, у детей младшего возраста - мазок с задней стенки глотки, а также мазки из носа. Изучали бактериологические посевы из дыхательных путей больных МВ в соответствии с приказом №535 Минздрава «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» с разработанными нами модификациями и дополнениями [127,153]. Предварительно мокроту отмывали в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и обрабатывают 1% раствором дитиотреитола (соотношение 1:1).

2.2 Методы исследования

Выделение бактерий *P. aeruginosa* проводили культивированием на селективном агаре ЦПХ (N-цетилпиридиний хлористый). Изоляты *P. aeruginosa* типичного фенотипа идентифицировали по наличию пигмента и характерного запаха (винограда или земляничного мыла), гемолизу на 5% кровяном агаре, положительному тесту на оксидазу, а также по способности расти при 42°C.

Для идентификации бактерий атипичного фенотипа использовали Малди-тоф масс-спектрометрию. Спектрометрический анализ белковой фракции лизата микробной клетки позволяет определить его прямой белковый профиль, своеобразный «отпечаток пальца» микроорганизма. Для проведения экстракции в каждую пробирку с 300 мкл деионизированной воды вносили 1-5 изолированных колоний микроорганизма и тщательно перемешивали. К полученной суспензии добавляли 900 мкл 95% этилового спирта, затем центрифугировали (2 мин, 13 000 об/мин). После этого удаляли супернатант, к осадку добавляли 30-50 мкл 70% водного раствора муравьиной кислоты, эквивалентный объем ацетонитрила, затем

перемешивали на вортексе и центрифугировали (2 мин, 13 000 об/мин). На ячейку мишени наносили 1,0 мкл супернатанта (в 3 повторностях для каждого изолята). На высушенные на ячейках супернатанты наносили по 1,0 мкл матрицы – α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Полученную смесь высушивали при комнатной температуре. Для масс-спектрометрического исследования использовали оборудование UltrafleXtreme (Bruker daltonics, Bruker, Германия).

Исследование антибиотикочувствительности

Антибиотикочувствительность изолятов *P. aeruginosa* определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона согласно МУК 4.2.1890-04 и с использованием тест-системы АТВ pse 5 (Biomerieux, Франция) и методом микроразведений в бульоне [154]. Контроль качества определения чувствительности проводили с помощью контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853. Исследование чувствительности к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa* проводили на момент их выделения и для интерпретации результатов (антибиотикочувствительности *P. aeruginosa* использовали критерии в соответствии с действующими на тот момент рекомендациями CLSI, EUCAST [155,156]. Исследование чувствительности к имипенему, меропенему, азлоциллину, гентамицину, офлоксацину, цiproфлоксацину, левофлоксацину, тобрамицину, азтреонаму, пиперациллин-тазобактаму проводили диско-диффузионным методом. Определение резистентности к колистину проводили методом микроразведений в бульоне согласно методическим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [157]. С помощью тест-системы АТВ определяли чувствительность согласно инструкции производителя к следующим АБП: ампициллин-сульбактаму, тикарциллину, тикарциллину pse (ticp), тикарциллин-клавулановой кислоте, тикарциллин – клавулановой кислоте pse, пиперациллину, пиперациллину, пиперациллин-тазобактаму, пиперациллин-тазобактаму, меропенему, амикацину, колистину, ко-тримоксазолу.

Изучение способности изолятов *P. aeruginosa* образовывать биопленки и исследование фагочувствительности

Способность штаммов *P. aeruginosa* к образованию биопленок (БП) определяли на поверхности 96-луночного полистиролового планшета [158]. Оптическую плотность (ОП) БП измеряли на спектрофотометре (длина волны 540 нм). Исследование проводили в 6 повторностях. Количественным выражением степени образования БП служили значения ОП, измеряемые на спектрофотометре. В зависимости от значений ОП штаммы были отнесены к 3 группам: 1) с выраженной способностью образовывать БП (ОП составляла более 0,6); 2) с умеренной способностью образовывать БП (ОП составляла от 0,4–0,6); 3) с низкой способностью образовывать БП (ОП была менее 0,4).

Для исследования фагочувствительности *P. aeruginosa* использовали диагностические бактериофаги «Микроген» (Россия): пиобактериофаг поливалентный, интести-бактериофаг и синегнойный бактериофаг согласно инструкции производителя.

Мутабельность изолятов *P. aeruginosa*

Мутабельность изолятов *P. aeruginosa* изучали методом серийных разведений на агаре Мюллера-Хинтона с добавлением рифампицина [159,160]. Величину спонтанных мутаций *P. aeruginosa* определяли соотношением количества колоний, выросших на чашках с рифампицином, к количеству колоний, выросших без рифампицина. Согласно критериям, предложенным Дервля Т., в зависимости от частоты мутаций изоляты относили к 4 категориям: гипомутабельным, если величина частоты мутаций была менее 7×10^{-9} , к нормомутабельным – в диапазоне от 7×10^{-9} до 2×10^{-7} , к слабым мутаторам от 2×10^{-7} до 1×10^{-6} , к сильным мутаторам, если величина частоты мутаций была больше или равна 1×10^{-6} [159,160].

Фенотипические и генотипическое исследование наличия генов M β L у
изолятов *P. aeruginosa*

Продукцию металло-бета-лактамаз (M β L) *P. aeruginosa* исследовали диско-диффузионным методом двойных дисков, детекцию генов M β L проводили методом ПЦР, а также ПЦР в режиме «реального времени». Изучение M β L фенотипическим скрининговым методом «двойных дисков с ЭДТА» проводили согласно методическим рекомендациям «Металло-бета-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий» [161]. Возникновение зоны синергизма между диском ЭДТА и диском, содержащим β -лактамные антибиотики, интерпретировали как продукцию M β L *P. aeruginosa* [161].

Выделение ДНК и амплификацию проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции» [162]. Экстракцию ДНК *P. aeruginosa* проводили из чистой культуры, используя комплект реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ».

Скрининг генов M β L Vim1, Vim2, Imp1, Spm1, Gim1 *P. aeruginosa* проводили методом ПЦР. В ходе исследования были использованы 5 пар праймеров («Синтол»), представленные в таблице 3 [163, 164].

Таблица 3 – Праймеры для выявления M β L у бактерий *P. aeruginosa*.

Праймеры	Последовательность	Размер
VIM1 f VIM1 r	5-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3 5-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3	261
VIM2 f VIM2 r	5-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3 5-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'	801
IMP1 f IMP1 r	5-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3 5-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'	587
SPM1 f SPM1 r	5-GCG TTT TGT TTG TTG CTC-3 5-TTG GGG ATG TGA GAC TAC-3	786
GIM1 f GIM1 r	5-AGAACCTTGACCGAACGCAG-3 5-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3	457

Реакцию ПЦР проводили при следующих условиях. После начальной денатурации при 95°C в течение 2 мин, устанавливали 30 циклов амплификации в режиме: денатурация при 95°C (1 мин), отжиг 53°C (1 мин), элонгация при 72°C (2 мин), элонгация при 72°C (10 мин). Состав реакционной смеси содержал по 1 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера.

Детекцию генов MβL групп VIM, IMP и NDM проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» при помощи приборов Light Cycler 480 II (Roshe) и CFX-96 (Bio-Rad), используя набор MDR MBL-FL («Амплисенс») согласно его инструкции. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл: 5 мкл смеси ПЦР-2-FRT, 10 мкл ПЦР-смеси 1-FRT, ДНК - 10 мкл. При анализе проб ДНК *P. aeruginosa* использовали программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (Таблица 4).

Таблица 4 – Программа амплификации при выявлении генов MβL.

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1.	95	15 мин	1
2.	95	5 сек	5
	60	20 сек	
	72	15 сек	
3.	95	5 сек	40
	60	30 сек	
	72	15 сек	

Изучение генетического родства изолятов проводили методом RAPD-ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA) с произвольным праймером, размером 10 нуклеотидов Short 1 (AATCGGGCTG, «Синтол»).

Исследование чувствительности 67 изолятов *P. aeruginosa* к дезинфектантам проводили путем определения минимальной подавляющей концентрации ДС к конкретному штамму. Исследуемые изоляты *P. aeruginosa* были разделены на 3 группы: 1) изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из

мокроты детей больных МВ (ДМВ), 2) изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из мокроты взрослых больных МВ (ВМВ), 3) изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из зева, уха, мочи, ран (абдоминальное отделяемое) взрослых больных, не страдающих МВ (НеМВ), при острой синегнойной инфекцией. Исследование проводили в соответствии с Руководством "Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности" Р 1.1.2.3.5.-10. и методическими рекомендациями "Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам" [165,166,167] по режимам, указанным в инструкции по применению конкретного ДС. Исследование чувствительности *P. aeruginosa* к ДС проводили в трех вариантах: 1) исследование для обеззараживания медицинских изделий, 2) исследование в растворе, 3) исследование на поверхностях в помещениях. При определении чувствительности *P. aeruginosa* к ДС для обеззараживания медицинских изделий в качестве тест-объектов использовали медицинские тест-изделия: стерильные пластик и перчатки медицинского назначения. При определении чувствительности выделенного штамма микроорганизма к ДС, используемых для обеззараживания поверхностей в помещениях, в качестве тест-объекта использовали кафельную плитку. В исследовании использовали следующие дезинфектанты: «Миродез универ» (МиУ) на основе ЧАС и альдегида с концентрацией в процентах С ($C=0.08-0.25$), хлорсодержащий «Торихлор» ($C=0.00375-0.15$), «Изумруд» (ИЗ) на основе ЧАС, гуанидина и ПАВ ($C=0.1-0.5$). На тест-поверхностях медицинского назначения изучали устойчивость изолятов *P. aeruginosa* к 70% этиловому спирту в течение 15 и 30 сек.

Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к дезинфектантам

Перед оценкой чувствительности *P. aeruginosa* к ДС готовили суспензию культуры в стерильном физиологическом растворе. Микробную взвесь исследуемого штамма *P. aeruginosa* доводили до 5 единиц (5×10^8 КОЕ/мл) по

стандарту мутности для оптической стандартизации бактерий. В качестве нейтрализаторов применяли 0,1-1,0% растворы тиосульфата натрия; универсальный нейтрализатор, содержащий Твин 80 (3 %), сапонин (0,3—3 %), гистидин (0,1 %), цистеин (0,1 %); а для спирта – вода.

Штамм относили к устойчивому к данному дезинфектанту в изучаемом режиме при использовании ДС для обеззараживания изделий медицинского назначения при наличии роста микроорганизмов 1 КОЕ/мл и более. Штамм считали устойчивым к данному дезинфектанту при исследовании на поверхностях в помещениях в различных вариантах при росте 300 КОЕ/мл и более. Штамм относили к чувствительному при отсутствии роста или при росте не более 300 КОЕ/мл, что соответствует требуемой эффективности ДС (гибель 99,99% микроорганизмов). При росте менее 300 КОЕ/мл различали степень чувствительности: полная чувствительность – при отсутствии роста; неполная чувствительность – при наличии роста от 1 до 299 КОЕ/мл. Дезинфектант оказывает неполное бактерицидное действие при наличии роста от 1 до 99 КОЕ/мл, суббактерицидное действие при наличии роста от 100 до 299 КОЕ/мл [167].

Эпидемиологические методы исследования

Для эпидемиологической характеристики хронической инфекции легких у пациентов с МВ, вызванной *P. aeruginosa* использовали описательно-оценочные методы, содержащие описательную статистику, и аналитические методы исследования “случай-контроль” и когортное исследование [168,169]. Всего проанализировано 359 анкет больных МВ и 185 историй болезни (хронической инфекцией легких, вызванной *P. aeruginosa*. Полученные данные были проанализированы по возрасту, месту жительства, течению заболевания, проводимой терапии с помощью антибиотиков, а также смертностью детей с МВ. Истории болезни 97 больных МВ детей, исследованных с 2020 по 2021 гг.,

содержали также данные о возрасте постановки диагноза МВ, тяжести течения, типе мутации гена CFTR.

Нами разработаны анкеты «Исследование условий быта и микрофлоры внешней среды, в которых проживают дети с МВ» для опроса родителей. Анкеты включали следующие данные ребенка: дату рождения, микробиологический диагноз, состав семьи и наличие няни, ухаживающей за ребенком, наличие хронических бронхолегочных заболеваний у членов семьи, характер санузла (совмещенный, отдельный), наличие животных, названия моющего средства и ДС для ухода за небулайзером, названия моющего и ДС, используемых в санузле, время их экспозиции, способ стерилизации небулайзера, метод сушки, длительность сушки. В ходе исследования были описаны и проанализированы условия проживания 25 детей МВ и их семей. С целью изучения окружающей среды пациентов МВ вне стационара проводили бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней домашней среды, опираясь на методические рекомендации «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях» МУК 4.2.2942-11 [170]. Отбор проб с поверхностей изучаемых объектов осуществляли методом смывов. Были исследованы 247 смыва, выделенных из домашней внешней среды 25 детей (2 ребенка в динамике). Смывы были взяты с поверхностей следующих объектов: маска небулайзера до ингаляции, после ингаляции, после обработки; небулайзерная камера до ингаляции, после ингаляции, после обработки; слив раковины до уборки, зубная щетка, фильтр компрессора, в нескольких семьях дополнительно были взяты внутренняя поверхность детской пластиковой бутылочки, поверхность соски.

Описательно-оценочные методы использовали для описания структуры хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*, среди больных МВ детей и взрослых, определения частоты высева доминирующих микроорганизмов в ассоциации с *P. aeruginosa*, определения уровня резистентности выделенных

изолятов к антимикробным препаратам и различным ДС, изучения фенотипических, описания распространенности эпидемически значимых сиквенс-типов среди больных МВ в России.

Аналитический метод был применен в исследовании 1) “случай-контроль” при оценке гипотез о факторах риска в колонизации легких больных МВ, *P. aeruginosa*, 2) в когортном исследовании при сравнении микрофлоры дыхательных путей разных возрастных групп, госпитализированных и амбулаторных больных, при исследовании фенотипических свойств как эпидемических маркеров изолятов, выделенных от детей и взрослых и 3) определении направлений профилактики в соответствии с факторами риска.

Статистические методы исследования

Для анализа данных и графического представления результатов применяли методы статистики с использованием программы «Excel».

Расчёт значений по сравниваемым группам пациентов проводили при $p < 0.05$, используя t-критерия Стьюдента и критерий согласия Пирсона хи-квадрат.

Индекс разнообразия Симпсона, который показывает вероятность того, что различные изоляты из популяции могут быть отнесены к разным кластерам рассчитывали по формуле Хантер-Гастона [130].

Исследования проводились в соответствии с этическими принципами, которые берут начало в Хельсинской Декларации (ICH Harmonized Tripartite Guideline for GCP).

До начала исследований от всех пациентов было получено информированное согласие, форма которого не противоречит международным этическим нормам и одобрена этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (Заключение этического комитета ФГБНУ «МГНЦ», протокол №2/2 от 10 февраля 2021).

Глава 3. Микробиологические и эпидемиологические характеристики ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*.

3.1. Микробиологические особенности ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*.

В результате проведенного мониторинга микрофлоры нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом в период 2012-2021гг. включительно у 636 пациентов с МВ (525 детей и 111 взрослых) были выделены бактерии *P. aeruginosa* (793 изолята). Доля моноинфекции, вызванной *P. aeruginosa*, составляла 41% у детей и 30% у взрослых.

Моноинфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, выявляли в разных возрастных группах детей с МВ. Начиная с возраста 7 лет наблюдали рост частоты встречаемости моноинфекции среди детей с МВ.

Среди 217 обследованных детей с МВ с ХИЛ, вызванной моноинфекцией *P. aeruginosa* было 116 девочек (53%) и 101 (47%) - мальчик. Моноинфекцию диагностировали в 17% (37) случаев у детей в возрасте от 0 до 2 лет, в 21% (45) - у детей дошкольного возраста от 3 до 6 лет и в 62% (135) случаев у детей в возрасте 7-18 лет (рисунок 5).

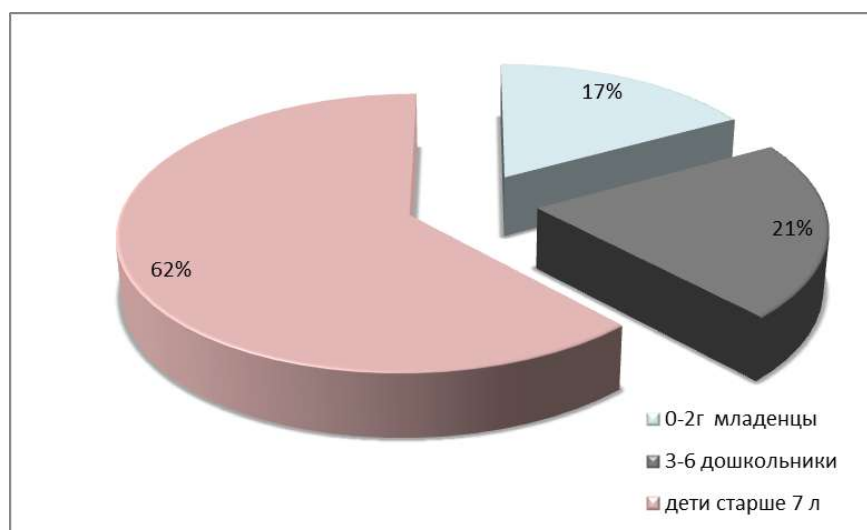


Рисунок 5. Моноинфекция *P. aeruginosa* в разных возрастных группах детей МВ

Инфекция, вызванная *P. aeruginosa* в ассоциации с другими микроорганизмами, среди детей составила 59%. Частота ассоциаций была следующая: *P. aeruginosa* + *S. aureus* (50%), *P. aeruginosa* + *Candida spp.* (11%), *P. aeruginosa* + *S. aureus* + *Candida spp.* (9%), *P. aeruginosa* + *S. maltophilia* (3%), *P. aeruginosa* + *E. coli* (5%), *P. aeruginosa* + *K. pneumoniae* (3%), *P. aeruginosa* + *Enterobacterales* (3%), *P. aeruginosa* + *Achromobacter spp* (7%), *P. aeruginosa* + BCC (5%), *P. aeruginosa* + *Acinetobacter spp.* (2%), *P. aeruginosa* + другие грамотрицательные микроорганизмы (*P. putida*, *Chryseobacterium indologenes*, *Rhizobium radiobacter*) (2%), представлена на рисунке 6.

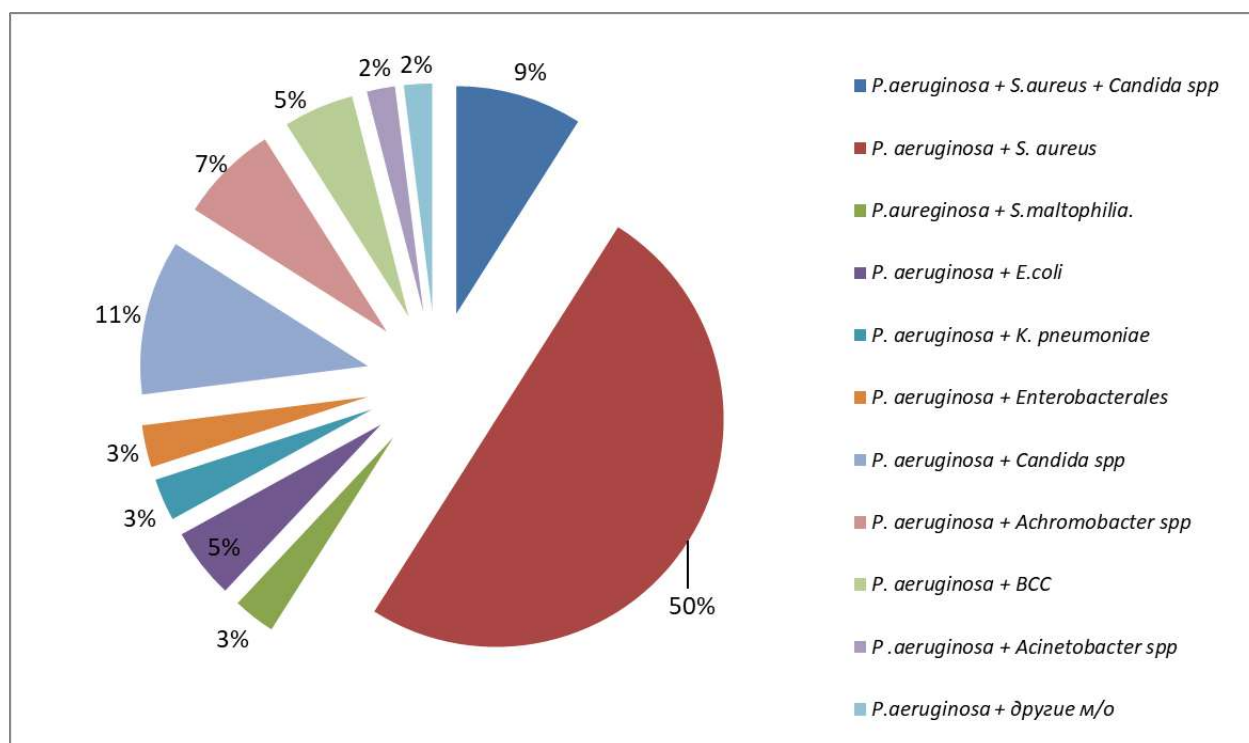


Рисунок 6. Частота встречаемости *Pseudomonas aeruginosa* в ассоциации с другими микроорганизмами среди детей МВ (2012-2021гг.)

Инфекция, вызванная *P. aeruginosa* в ассоциации с другими возбудителями, среди взрослых больных МВ составила 70% и была представлена следующими ассоциациями (Рисунок 7): *P. aeruginosa* + BCC (34%), *P. aeruginosa* + *S. aureus* (21%), *P. aeruginosa* + *Achromobacter spp* (15%), *P. aeruginosa* + *Achromobacter spp* + *S. aureus* (5%), *P. aeruginosa* + другие НГОВ (*S. maltophilia*, *P. fulva*, *P. tolaasii*, *O. anthropi*, *Sphingomonas spp.* и др. (5%), *P. aeruginosa* + *K. pneumoniae* (7%), *P.*

aeruginosa + *Candida* spp. (7%), *P. aeruginosa* + *Enterobacterales* (5%), *P. aeruginosa* + *Achromobacter* spp + BCC (1%).

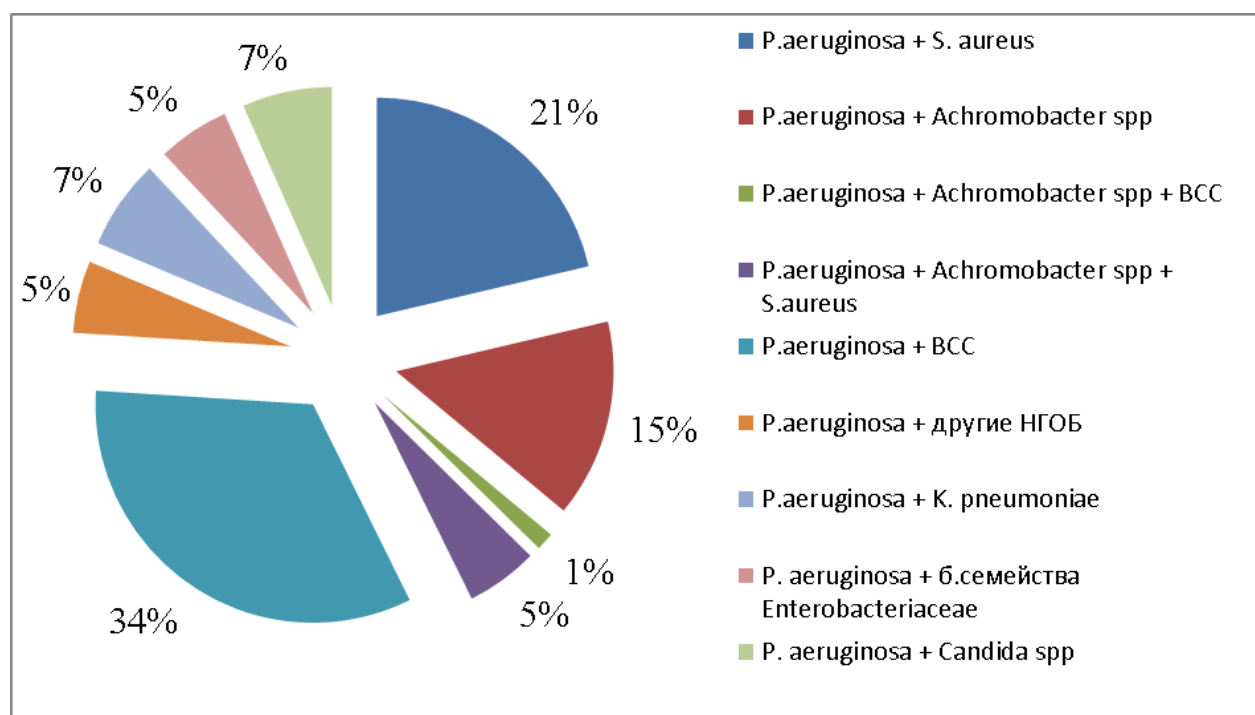


Рисунок 7. Частота встречаемости *Pseudomonas aeruginosa* в ассоциации с другими микроорганизмами среди взрослых с МВ (2012-2021гг).

Различия видового состава ассоциаций *P. aeruginosa* у детей и взрослых вероятно связано с различной частотой «тяжелых» и «мягких» генотипов нуклеотидной последовательности гена CFTR среди детей и взрослых. «Тяжелые» генотипы доминируют как среди детей, так и взрослых, но до 18 лет их частота составляет 80,6%, а после 18 лет – 63,3% (Регистр 2021).

Состав микробного пейзажа нижних дыхательных путей детей МВ, инфицированных *P. aeruginosa* зависел от возраста детей (Рисунки 8,9,10). Проанализированные данные, собранные в течение 10 лет (2012-2021гг.), показали, что частота встречаемости ассоциации *P. aeruginosa* + НГОВ в младенческом возрасте (0-2 года) составляет 10.5% (Рисунок 8), далее в группе детей дошкольного возраста (3-6 лет) частота ассоциации *P. aeruginosa* + НГОВ незначительно снижается и составляет 8.9% за счет увеличения доли *S. aureus* (Рисунок 9), а у детей старше 7 лет происходит увеличение частоты

встречаемости этой ассоциации до 14% (Рисунок 10).

Частота встречаемости ассоциаций *P. aeruginosa* + *Enterobacterales* у младенцев составляет 21%, у дошкольников – 8.9%, т.е. на одинаковом уровне с ассоциацией *P. aeruginosa* + НГОВ в этой возрастной группе детей (Рисунок 9), а у детей старше 7 лет частота ассоциации *P. aeruginosa* + *Enterobacterales* снижается до 2.8% (Рисунок 10).

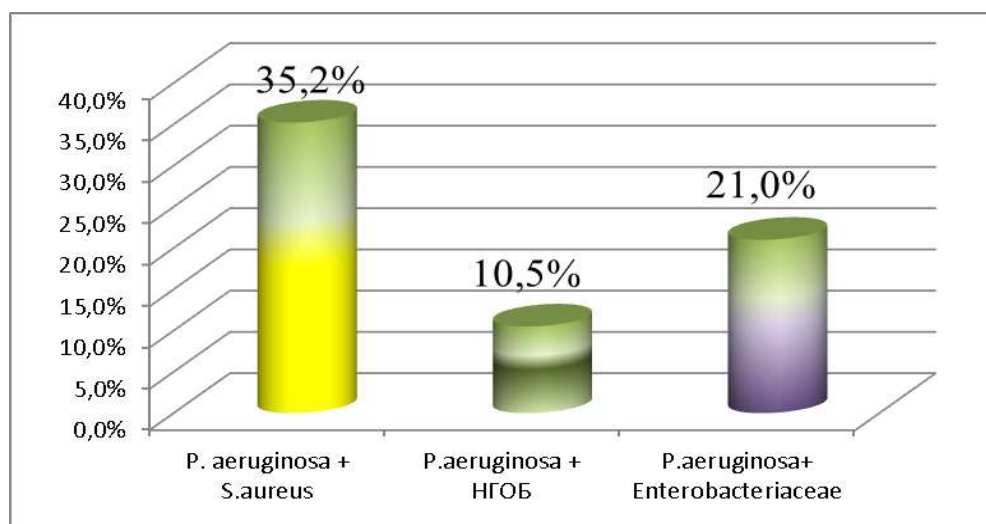


Рисунок 8. Частота высева ассоциации *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами в младенческой группе детей.

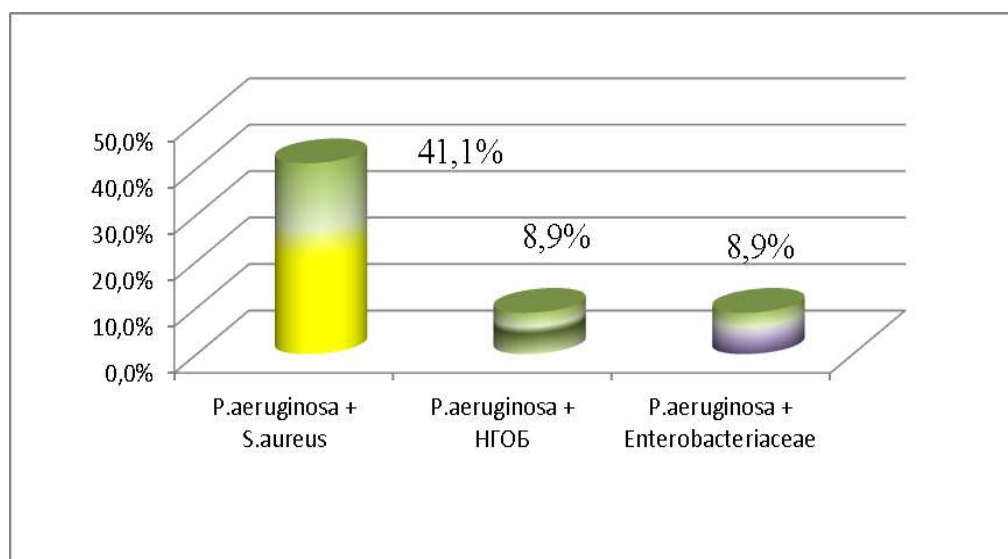


Рисунок 9. Частота высева ассоциации *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами в группе детей 3-6 лет.

Частота определения *P. aeruginosa* + *S. aureus* мало изменяется в разных возрастных группах и составляет у младенцев 35.2%, у школьников – 38.3 %, наибольшее значение достигается в возрасте 3-6 лет 41.1%.

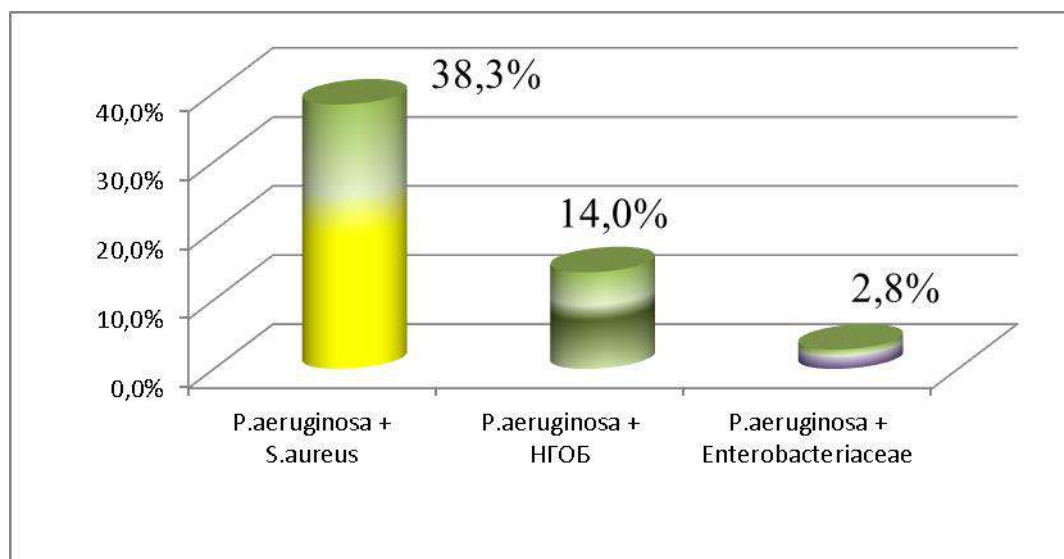


Рисунок 10. Частота высева ассоциации *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами в группе детей старше 7 лет

Таким образом, при анализе микрофлоры нижних дыхательных путей у детей больных муковисцидозом наблюдали моноинфекцию *P. aeruginosa* у 62% детей возраста от 7 до 18 лет. В составе ассоциаций *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами в этой возрастной группе происходит снижение частоты высева бактерий *Enterobacterales* до 2.8% и увеличение НГОБ до 14%.

3.2 Характеристика пациентов с хронической инфекцией легких, вызванной *P. aeruginosa*

В 2020-2021 гг. было обследовано 97 детей с МВ и хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*. С подтвержденным диагнозом «муковисцидоз» было 100% детей. У 72% детей с МВ наблюдали среднюю тяжесть течения болезни и у 28% - тяжелую. Из них диагноз «Кистозый фиброз. Муковисцидоз» был установлен в возрасте менее 1 мес. – у 42.3% детей, в возрасте 1-3 мес. – у

25.8%, 4-12 мес. – 6.2 % детей, 1 год-5 лет - 22.6%, 5-7 лет - у 2,1 % и старше 7 лет - 1% детей.

Среди 50 детей с хронической инфекцией легких, вызванной *P. aeruginosa* в ассоциации с другими микроорганизмами диагноз МВ был установлен при рождении в 42 % случаев. Среди 47 детей с хронической моноинфекцией, вызванной *P. aeruginosa*, диагноз МВ был установлен при рождении только в 30% случаев.

71% детей были из Москвы и Московской области, 29% из других регионов РФ (Таблица 5).

Таблица 5 – Регионы проживания обследованных детей МВ с хронической инфекцией легких, вызванной *P. aeruginosa* (2020-2021гг.).

Регион РФ	Количество детей	
	чел	%
Москва и МО	69	71
Краснодарский край	4	4
Ростовская область	4	4
Республика Крым	1	1
Калужская область	1	1
Тверская область	6	6
Брянская область	1	1
Липецкая область	1	1
Томская область	2	2
Красноярский Край	1	1
Челябинская область	1	1
Якутская область	3	3
Архангельская область	2	2
Республика Марий Эл	1	1

Данные о мутации гена CFTR имели 74 % детей. Генетические варианты мутации гена CFTR детей с хронической инфекцией легких, вызванной *P. aeruginosa*, представлены в таблице 6. В результате анализа анкетных данных выявлена группа риска среди детей с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, имеющих 18 наиболее часто встречающихся мутаций гена CFTR из более 2000. Было установлено, что наиболее часто у пациентов с ХИЛ, вызванной, *P. aeruginosa*,

встречалась мутация 508 del/508del, которая была выявлена у 39.2% пациентов. Показано, что фактором риска для развития хронической инфекцией легких, вызванной бактериями *P. aeruginosa* у детей является гетерозиготный генотип по «F508 del». Это может говорить о том, что наличие этой мутации может быть фактором риска для развития хронической инфекцией легких.

Таблица 6 - Генетические варианты мутаций у больных детей с МВ с хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*

Название генетических вариантов гена <i>CFTR</i>	Количество детей, %
508 del/508del	39.2
F508del/CFTRdele2,3(21kb)	5,2
2143del/CFTRdele2,3 21kb	3,1
F508del/2143delT	2,1
F508del/N1303K	7,2
c.252T>A/F508 del	2,1
F508 / 3821delT	1,0
1677delTA/N1303K	3,1
F 508 del/3849+10kb	3,1
delF508/2184 insA	1,0
2184insA/L138ins	1,0
del F508/3944delGT	1,0
delF508/c3528delC	1,0
F508del/W1282R	1,0
F508/S466x(TGA)	1,0
F508del/CFTRdup6b-10	1,0
F508del/G542X	1,0
F508del/ 4242+1G>A.	1,0

Полученные данные указывают на важность ранней постановки диагноза МВ и необходимость скорейшего исследования микрофлоры дыхательных путей для осуществления необходимой терапии, препятствующей ранней колонизации *P. aeruginosa*.

Проанализированы анамнестические данные у 331 пациента МВ с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, с 2005 по 2023 год. Выявлено, что у 23 (7%) пациентов с

МВ ХИЛ, вызванная *P. aeruginosa*, привела к смертельному исходу. Смерть у больных наступила в возрасте от 4 до 24 лет.

3.3. Результаты микробиологического мониторинга.

Исследования в динамике микробного пейзажа дыхательных путей 101 ребенка с синегнойной инфекцией, больных МВ, в течение от 6 мес. до 9 лет показали, что за время наблюдения произошла смена возбудителей: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *E. asburae*, *E. bovis*, *S. maltophilia*, *Candida spp.* на *P. aeruginosa* и установление моноинфекции *P. aeruginosa* у 34% детей (Таблица 7). У 66% детей в динамике наблюдали высеивание из нижних дыхательных путей *P. aeruginosa* в ассоциации с другими микроорганизмами (Таблица 8).

Таблица 7 – Исследование в динамике микрофлоры дыхательных путей детей МВ при моноинфекции *P. aeruginosa*.

Пациент	Возраст пациента, лет	Дата	Микроорганизм (КОЕ)
№1	5	27.01.15	<i>S. aureus</i> (10^3)
	6	10.12.16	<i>P.aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^2)
	9	10.10.19	<i>P.aeruginosa</i> (10^2)
	10	02.08.20	<i>P.aeruginosa</i> (10^1)
№2	5	19.01.17	<i>P.aeruginosa</i> (10^1), <i>S.aureus</i> (10^2), <i>K. pneumoniae</i> (10^2)
	7	18.06.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
	8	31.10.19	<i>P.aeruginosa</i> (10^2)
	10	20.05.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№3	7	03.07.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	8	12.02.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)
	9	19.02.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	10	18.05.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)
№4	3	10.03.20	<i>P. aeruginosa</i> (1 КОЕ)
	4	14.09.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)

№5	1	28.09.16	<i>P. aeruginosa</i> (1 KOE)
	2	07.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№6	9 мес	21.06.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>E. coli</i> 10^5
	2	30.09.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	3	25.03.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)
№7	6	01.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>K. oxitoca</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (5×10^2)
	7	01.02.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)
№8	1	26.04.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)
	2	28.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1)
№9	16	19.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^1)
	17	07.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№10	2	25 фев 16	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^2)
	3	1 июл 16	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	4	22.11.2017	<i>P.aeruginosa</i> (3×10^1)
№11	5	30 окт 14	<i>P.aeruginosa</i> (5×10^2)
	7	1 апр 16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№12	1	30.10.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	2	23.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)
№13	15	09.06.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>S. aureus</i> (10^2), <i>BCC</i> (10^1)
	17	21.02.2017	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№14	15	25 фев 14	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	16	30 окт 14	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№15	7	20.11.2017	<i>P. aeruginosa</i> (1)
	7	11.07.2018	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. aureus</i> (10^1)
	8	11.07.2018	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	10	20 окт 20	<i>P. aeruginosa</i> (4)
№16	16	05.12.2018	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	17	16.10.2019	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^5)

№17	5	12.11.2019	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>S. maltophilia</i> (10^4)
	6	21.07.20	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1)
	7	25.10.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
№18	6	17.01.2018	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^2)
	7	11.12.2018	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	9	13.01.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№19	6	24.06.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
	7	25.12.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^7)
№20	6	12.11.17	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1)
	8	05.03.19	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1)
	8	19.06.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)
№21	11	13.11.15	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^1), <i>E. coli</i> (5×10^2)
	14	29.10.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
№22	9	26.01.2017	<i>P. aeruginosa</i> (1)
	10	04.04.2018	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)
	13	14.04.21	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^2)
№23	9 мек	01.11.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>E. coli</i> (10^2)
	1 г 7 мек	12.09.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№24	8	21.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>E. cloacae</i> (10^2)
	9	27.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>E. asburae</i> (10^1)
	10	02.07.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	11	24.11.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
№25	7	19.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
	8	15.11.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	9	01.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№26	16	30.09.15	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^1)
	17	16.06.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^6), <i>S. aureus</i> (10^2)
	18	07.04.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
	19	20.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№27	7	20.12.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)

	12	15.06.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	12	26.09.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№28	15	05.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (5×10^1)
	16	24.01.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^6)
	17	10.05.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№29	2	01.07.18	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>E. coli</i> (10^2), <i>S. maltophilia</i> (2)
	3	30.09.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№30	6	16.10.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^5)
	7	05.08.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	8	24.11.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№31	13	06.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^1)
	14	18.10.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	15	13.02.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	16	13.05.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№32	2	30.10.13	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>Candida spp</i> (10^3)
	4	26.04.16	<i>P. aeruginosa</i> 10^6 , <i>A. ruhlandii</i> (10^7)
	5	18.10.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
№33	12	01.04.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^6), <i>E. coli</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^5)
	12	01.10.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
№34	1г10мес	29.05.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>E. bovis</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^1)
	3	25.09.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)

Микробиологический мониторинг микрофлоры дыхательных путей пациента (№1) в возрасте до 5 лет показал наличие только *S. aureus* (10^3), в 6 лет наблюдали первый высеv *P. aeruginosa* (10^2) в ассоциации *S. aureus* (10^2), а в 9 и 10 лет диагностировали *P. aeruginosa* моноинфекцию. Таким образом, произошла смена возбудителя *S. aureus* на *P. aeruginosa*. У пациентки (№17), в 5 лет

наблюдали первый высев *P.aeruginosa* в ассоциации с *S. maltophilia*, последующие исследования мокроты в 6 лет и 7 лет подтвердили наличие моноинфекции *P.aeruginosa*. У ребенка (№5) с МВ первый высев *P. aeruginosa* показал 1 КОЕ в возрасте 1 года, а уже в 2 года концентрация *P. aeruginosa* составила 10^2 КОЕ. И у ребенка (№4) в 3 года регистрировали первый высев *P. aeruginosa* также в количестве 1 КОЕ, а спустя 6 мес исследование показало наличие *P. aeruginosa* в концентрации 10^5 КОЕ. Таким образом, микробиологический мониторинг показал, что первый высев бактерий *P. aeruginosa* можно наблюдать в возрасте от 9 месяцев до 16 лет. Так как *P. aeruginosa* является доминирующим возбудителем ХИЛ у пациентов с МВ, необходимо осуществлять постоянный микробиологический мониторинг *P. aeruginosa* инфекции у детей больных МВ после ее первого высева вне зависимости от концентрации бактерий в мокроте и проводить лечение, способствующее эрадикации этих бактерий из дыхательных путей для профилактики ХИЛ.

Таблица 8 – Микробиологический мониторинг микрофлоры дыхательных путей детей МВ, инфицированных *P. aeruginosa* в ассоциации с другими микроорганизмами.

Пациент	Возраст, лет	Дата	Микроорганизм (КОЕ)
№35	6	14.11.17	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)
	9	02.09.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. marcescens</i> (10^6)
	10	23.09.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (5×10)
№36	10	28.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>Candida spp</i> (10^2)
	11	01.01.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)
	11	01.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>Candida spp</i> (10^1)
№37	17	27.02.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>B. cepacia</i> (10^4)
	17	06.07.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>B. cepacia</i> (10^5)
	18	31.07.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>B. cepacia</i> (10^3)
№38	3	20.03.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>A. xylosoxidans</i> (10^1)

	7	19.09.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>A. xylosoxidans</i> (2×10^1)
№39	6 мес	13.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (3×10^1)
	2 года	28.10.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>Candida albicans</i> (10^2)
№40	1 год	29.07.14	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^1), <i>K. oxitoca</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^1)
	4 года	05.07.05	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. aureus</i> (10^2)
	5	01.04.18	отрицательный высев <i>P. aeruginosa</i>
	6	02.04.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^8)
	7	03.07.20	<i>S. marscens</i> (10^3)
	8	16.09.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. maltophilia</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^4)
№41	1	30.11.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)
	2	22.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (8×10^1), <i>S. aureus</i> (10^1), <i>A. ruhlandii</i> (2)
	2	12.04.17	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. aureus</i> (10^2)
	5	05.03.20	<i>S. aureus</i> (10^1)
№42	17	25.06.13	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)
	17	06.07.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	19	29.09.16	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^2), <i>A. xylosoxidans</i> (10^4)
№43	17	14.02.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>BCC</i> (10^5)
	18	29.05.13	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>BCC</i> (10^4)
№44	13	13.03.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3)
	15	28.01.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>Candida spp</i> (3×10^2)
№45	16	25.02.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)
	19	28.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>S. maltophilia</i> (10^3)
№46	3	21.09.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)

	3	25.04.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (5×10^1)
	3	25.07.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^4), <i>A. junii</i> (10^3), <i>E. cloacae</i> (10^5)
№47	7	03.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	7	01.08.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>Candida spp</i> (10^3)
№48	8	16.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^6), <i>S. aureus</i> (6×10^4)
	9	24.07.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^1)
	12	10.08.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^5)
№49	8	02.02.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^5)
	9	01.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^4)
	9	24.08.16	<i>P. aeruginosa</i> (4×10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
№50	11	02.02.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>Candida spp</i> (10^2)
	11	01.11.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (5×10^2)
№51	6 мес.	02.11.17	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. aureus</i> (5×10^1), <i>K. pneumoniae</i> (10^2)
	1 г 5 мес.	01.10.18	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>K. oxitoca</i> (10^3)
	3	21.07.20	<i>S. aureus</i> (10^2)
	4	01.11.21	Отрицательный высев <i>P. aeruginosa</i>
№52	17	19.12.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	18	22.08.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>B. cepacia</i> (10^3)
№53	11	02.02.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^2)
	11	13.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^5), <i>A. xylooxidans</i> (10^2)
	11	24.08.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>A. ruhlandii</i> (10^2)
	11	30.11.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>A. ruhlandii</i> (10^2)
№54	4	11.10.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^3)
	5	05.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (10^2)
№55	1	15.02.18	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. maltophilia</i> (3)

	2	10.09.19	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>S. aureus</i> (10^2), <i>K. oxytoca</i> (10^2), <i>P. monteilii</i> (10^2)
№56	7	27.04.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>Candida spp</i> (10^2)
	7	18.10.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (5×10^2)
	8	01.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
№57	8 мес.	31.10.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
	1 г 2 мес.	04.03.20	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (3)
№58	1	01.02.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>S. aureus</i> (10^1), <i>E. coli</i> (10^3)
	2	01.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>S. aureus</i> (10^4), <i>E. coli</i> (10^5)
№59	12	01.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^2), <i>S. maltophilia</i> (10^2), <i>A. xylosoxidans</i> (10^1)
	13	08.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (5×10^2), <i>Acinetobacter spp</i> (10^2)
№60	16	15.04.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	16	20.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^4), <i>A. xylosoxidans</i> (10^3)
	17	29.09.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^2)
№61	1г 11 мес	02.07.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	2	15.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)
	3	26.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)
№62	7	16.10.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^3)
	8	22.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	9	28.01.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
№63	15	25.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>B. cepacia</i> (10^7)
	15	20.12.16	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>B. cepacia</i> (2×10^1)
	16	26.01.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>B. cepacia</i> (10^3)
	17	29.04.19	<i>P. aeruginosa</i> (3), <i>B. cepacia</i> (3)

№64	2	28.08.15	<i>P. aeruginosa</i> (10^2)
	8	06.08.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^5)
№65	8	30.10.15	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^3)
	10	03.12.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (3)
№66	11	30.04.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>Candida albicans</i> (10^3)
	11	26.09.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>C. albicans</i> (3), <i>A. ruhlandii</i> (10^1)
№67	5	16.07.18	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	6	28.01.19	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
	6	28.02.19	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
№68	16	18.06.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>A. ruhlandii</i> (10^4)
	18	10.02.21	отрицательный высев <i>P. aeruginosa</i>
№69	15	20.03.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	15	23.10.19	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (3×10^1)
№70	4	03.09.18	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>E. coli</i> (8), <i>A. ruhlandii</i> (10^2)
	4	27.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>E. cloacae</i> (10^4), <i>A. ruhlandii</i> (10^2)
	5	17.07.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>Candida spp</i> (5×10^1)
№71	6 мес	13.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (3×10^1)
	2	28.10.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^3)
№72	14	01.04.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>A. ruhlandii</i> (10^6), <i>E. coli</i> (10^3)
	15	01.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>A. ruhlandii</i> (10^6), <i>E. coli</i> (10^3)
№73	10	01.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^2), <i>S. aureus</i> (5×10^1), <i>E. coli</i> (10^1)
	11	01.07.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>Candida spp</i> (3×10^1)

	13	01.09.19	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	15	17.03.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (4×10^1)
№74	13	09.10.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. maltophilia</i> (10^3)
	14	11.03.20	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^2), <i>S. maltophilia</i> (10^4)
	14	01.12.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. maltophilia</i> (10^2)
	15	15.10.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. maltophilia</i> (10^6)
№75	11	29.06.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3)
		13.10.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^5)
№76	10	29.06.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (5×10^1)
	11	21.09.17	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (4×10^1)
	12	13.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	13	16.10.19	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. aureus</i> (10^4)
№77	5	27.07.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3)
	5	01.12.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^2)
	6	13.04.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^5)
	6	06.07.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>A. ursingii</i> (10^4)
	6	13.11.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>Candida spp</i> (10^3)
№78	8	27.07.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>S. marcescens</i> (10^4)
	9	02.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^4)
	9	22.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>S. marcescens</i> (10^2)
	10	29.09.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^5), <i>P. mirabilis</i> (10^5)
№79	9	23.04.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>A. insuavis</i> (10^1)
	10	06.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^7), <i>A. spanius</i> (10^1)
	11	03.09.20	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^2), <i>A. xyloxydans</i> (10^3)
№80	12	08.05.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^2)

	12	19.06.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^6)
	12	05.12.18	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (10^3)
№81	8	24.06.15	<i>P. aeruginosa</i> (10^5), <i>S. aureus</i> (10^4), <i>S. maltophilia</i> (10^4)
	9	15.07.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>Candida spp.</i> (10^3)
	10	11.09.17	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>A. junii</i> (10^4)
№82	12	01.12.15	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	14	30.11.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>Candida spp.</i> (10^2)
№83	7	16.02.18	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>S. aureus</i> (5×10^1), <i>S. maltophilia</i> (10^2)
	9	11.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>A. ruhlandii</i> (10^4)
	10	09.06.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (5×10^2), <i>A. ruhlandii</i> (10^2)
№84	10	16.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (3)
	10	11.04.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>R. ornithinolytica</i> (10^4)
	12	29.01.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>Candida spp</i> (10^1)
№85	4	12.10.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3)
	4	21.06.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^4), <i>S. maltophilia</i> (10^3)
№86	7	03.11.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^4)
	8	05.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (6), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>Candida spp</i> (5×10^1)
№87	14	28.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (3×10^1)
	15	08.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
№88	5	13.11.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3)
	6	03.02.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^4)
	9	09.03.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>Candida spp</i> (10^2)
	14	07.09.21	<i>P. aeruginosa</i> (5), <i>S. aureus</i> (10^3)

№89	9	15.06.15	<i>S. aureus</i> (10^3), <i>Candida spp</i> (5×10^2)
	10	05.05.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^5)
	12	18.07.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^3)
	13	12.11.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	14	24.03.20	<i>S. aureus</i> (10^1)
	14	05.08.20	<i>S. aureus</i> (10^4)
	14	28.01.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
	15	08.07.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^4)
№90	1	29.07.14	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^1), <i>K. oxytoca</i> (5×10^1), <i>S. aureus</i> (10^1)
	4	27.09.17	<i>P. aeruginosa</i> (2), <i>S. aureus</i> (10^2)
	5	01.04.18	отрицательный высев <i>P. aeruginosa</i>
	6	02.04.19	<i>P. aeruginosa</i> (10^8)
	7	03.07.20	<i>S. marscesens</i> (10^3)
	8	16.09.21	<i>S. maltophilia</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^4)
	8	11.11.21	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>P. fulva</i> (10^6), <i>S. aureus</i> (10^3)
№91	14	19.12.12	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>Candida spp</i> (10^2)
	14	22.02.13	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^2), <i>Candida spp</i> (10^1)
	15	28.05.14	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>S. aureus</i> (10^2)
№92	17	13.03.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>B. cepacia</i> (10^5)
	18	29.09.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>B. cepacia</i> (10^5), <i>Candida spp</i> (1)
№93	4	20.03.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>Achromobacter</i> (10^1)
	4	30.10.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^3)
	7	28.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (2×10^1), <i>A. ruhlandii</i> (10^1)
№94	5	21.03.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (7×10^1)
	6	03.09.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (2×10^1)
	7	20.05.13	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (5×10^1)

№95	13	13.03.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3)
	15	28.01.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>Candida spp</i> (2×10^2)
№96	17	12.05.12	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>B. cepacia</i> (10^4)
	18	16.09.13	<i>P. aeruginosa</i> (3×10^2), <i>A. xylosoxidans</i> (10^6), <i>S. aureus</i> (2×10^1)
№97	11	25.02.14	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (10^3)
	11	25.03.14	<i>P. aeruginosa</i> (10^2), <i>S. aureus</i> (10^5)
	11	30.10.14	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^1), <i>S. aureus</i> (10^5)
	14	28.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>S. aureus</i> (10^2)
	15	08.08.18	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^1), <i>S. aureus</i> (10^4)
№98	13	09.10.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^7), <i>A. pittii</i> (10^6)
	14	31.04.17	<i>P. aeruginosa</i> (6×10^5), <i>A. pittii</i> (10^5)
№99	15	27.07.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^4), <i>S. aureus</i> (10^3), <i>A. ruhlandii</i> (5)
	16	26.01.17	<i>P. aeruginosa</i> (10^3), <i>S. aureus</i> (10^2), <i>A. ruhlandii</i> (5)
№100	7 мес	28.01.15	<i>K. oxytoca</i> (10^3), <i>A. junii</i> (10^2)
	4	13.11.18	<i>P. aeruginosa</i> (10^1)
	6	25.11.20	<i>P. aeruginosa</i> (8), <i>S. aureus</i> (10^2)
№101	7	04.10.16	<i>P. aeruginosa</i> (10^1), <i>S. aureus</i> (10^1)
	7	11.11.16	<i>P. aeruginosa</i> (4), <i>S. aureus</i> (1)
	8	03.02.17	<i>P. aeruginosa</i> (5×10^2), <i>S. aureus</i> (10^2)

Мониторинг позволил выявить длительную персистенцию ассоциаций возбудителей ХИЛ при МВ. Наиболее часто встречалась *P. aeruginosa* в ассоциации с *S. aureus* у 22 человек (22%). Длительность персистенции в результате мониторинга такой ассоциации наблюдали от 3 мес. до 7 лет (Таблица 9). Ассоциация *P. aeruginosa* + бактерии рода *Achromobacter* была выявлена у 6 детей. У двоих из которых, *P. aeruginosa* выделяли в ассоциации с 2 микроорганизмами, у пациента (№72) *P. aeruginosa* + *A. ruhlandii* + *E. coli*, у

больного (№99) *P. aeruginosa* + *A. ruhlandii* + *S. aureus*. У 3 детей с МВ (№37, №43, №92) высевали *P. aeruginosa* в ассоциации с ВСС. Ассоциацией *P. aeruginosa* + *S. maltophilia* был представлен микробный пейзаж нижних дыхательных путей в течение 2 лет у пациентки (№74). Ассоциацию *P. aeruginosa* + *A. pittii* выделяли из мокроты больного (№98) в 13 и 14 лет.

Таблица 9 – Длительность выделения *P. aeruginosa* в динамике (моноинфекция и в ассоциации с другими патогенами)

Длительность выделения	Число пациентов с моноинфекцией (n=34 пациента)	Число пациентов с ассоциацией (n=67 пациентов)		
		<i>S. aureus</i> n=22	<i>Candida spp</i> n=3	НГОВ n=14
Менее года	10 (29%)	3 (14 %)	1 (33 %)	5 (36 %)
1 год	13 (38%)	7 (31,5 %)	1 (33 %)	4 (28 %)
2 года	4 (12%)	4 (18 %)	-	3 (21 %)
3 года	4 (12%)	2 (9 %)	-	1 (7 %)
4 года	2 (6%)	3 (14 %)	1 (33 %)	1 (7 %)
5 лет	1 (3%)	1 (4,5%)	-	-
6 лет	-	1 (4,5%)	-	-
7 лет	-	1 (4,5%)	-	-

У 15 пациентов наблюдали смену микроорганизмов в ассоциациях с *P. aeruginosa*. У пациента (№77) в 5 лет микробный состав микрофлоры нижних дыхательных путей был представлен *P. aeruginosa* (10^4), *S. aureus* (10^3), в 6 лет *P. aeruginosa* (10^5), а через 3 месяца *P. aeruginosa* (10^5), *A. ursingii* (10^4). Таким образом, произошла смена ассоциации *P. aeruginosa* + *S. aureus* на *P. aeruginosa* + *A. ursingi*. У трех пациентов (№44, №88 и №95) произошла смена ассоциации *P. aeruginosa* + *S. aureus* на *P. aeruginosa* + *Candida spp*, а у двух (№50 и № 91) наоборот ассоциации *P. aeruginosa* + *Candida spp* на *P. aeruginosa* + *S. aureus*.

Анализ исследования микробного пейзажа дыхательных путей больных МВ в динамике указывает на необходимость персонализированного подхода, постоянного мониторинга микробного состава нижних дыхательных путей, начиная с момента установления диагноза «муковисцидоз», контроля и отслеживания показателей – антибиотикочувствительности, чувствительности к дезинфектантам, смену генотипов, наличие эпидемически значимых штаммов *P.*

aeruginosa, а также исследование окружающей среды пациентов в домашних условиях для выявления и профилактики источников заражения *P. aeruginosa*.

3.4 Микробиологическая характеристика коллекции штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из мокроты детей и взрослых больных муковисцидозом

Была изучена микробиологическая характеристика 311 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из мокроты 199 больных МВ за 2005–2021 гг. – от 163 детей и 36 взрослых. В контрольную группу вошли 90 пациентов, не страдающих МВ.

С целью выявления характерных фенотипических особенностей изолятов *P. aeruginosa* МВ изучали фенотипы изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ (*P. aeruginosa* (МВ)) в сравнении с фенотипами *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих МВ (*P. aeruginosa* (HeMB)). 44.7% изолятов *P. aeruginosa* (МВ) выделяли пиовердин, 10.9 % пиоцианин, 10.9 % оксифеназин, 9.6 % - пиорубин и 0.6 % меланин. Пигменты не продуцировали 23.2% изолятов *P. aeruginosa* (МВ) (Рисунок 11в). 27 % изолятов *P. aeruginosa* (МВ) имели мукоидный фенотип (Рисунок 11б). 8% изолятов *P. aeruginosa* (МВ) были медленнорастущими, колонии которых имели мелкие размеры, диаметром менее 1мм, SCV–фенотип (Рисунок 11а). 62% изолятов *P. aeruginosa* были способны образовывать биопленки.

В процессе размножения бактерий *P. aeruginosa* атипичного фенотипа происходит активация вирулентности, в результате происходит повреждение клеток респираторного тракта, выработка медиаторов воспаления и повышение проницаемости капилляров [131]. Что способствует развитию хронического течения инфекции легких у пациентов с муковисцидозом, при котором возрастают иммунологические нарушения.



а)

б)



в)

Рисунок 11. Изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из мокроты больных МВ, атипичного фенотипа.

а) SCV-фенотип на расसेве культуры, б) мукоидный фенотип, в) изоляты фенотипов без пигмента.

Изучение фенотипов 91 изолята *P. aeruginosa*, выделенных из клинических образцов (зева, носа, мочи, уха, абдоминальное отделяемое) 90 амбулаторных пациентов, не страдающих муковисцидозом, показало, что среди них не

обнаружено штаммов атипичного фенотипа, т.е. продуцирующих альгинат, обладающих scv-фенотипом или не имеющих пигмента (Рисунок 12).



а)



б)

На фото а) представлены штаммы *P. aeruginosa*, продуцирующих желтый пигмент – оксифеназин (штаммы 010,012), зеленый пигмент – пиовердин (штамм 01), сине-зеленый пигмент – пиоцианин (штамм 020), смешанная культура (штаммы 04, 011), б) типичный фенотип на расewe культуры

Рисунок 12. Типичные фенотипы *P. aeruginosa*, выделенной от больных HeMB.

По результатам тестирования мутабельности изолятов *P. aeruginosa* по частоте возникновения спонтанных мутантов, резистентных к рифампицину были выделены 4 группы штаммов: гипомутабельные (I), нормомутабельные (II), слабые мутаторы (III), сильные мутаторы (IV) (Таблица 10).

Таблица 10 – Группы мутабельности изолятов *P. aeruginosa*.

Группы мутабельности <i>P. aeruginosa</i>	I	II	III	IV
Взрослые	84%	2%	4%	9%
Дети	72%	11%	6%	11%
HeMB	94%	3%	3%	0%

Гипомутабельные изоляты преобладали как среди штаммов *P. aeruginosa* (HeMB), так и *P. aeruginosa* (MB), в 94% изолятов у пациентов HeMB, в 72% у детей и в 84% изолятов, выделенных от взрослых. 9% штаммов *P. aeruginosa* (MB), выделенных от взрослых и 11% штаммов, выделенных от детей, имели высокую частоту мутаций ($f \geq 1 \cdot 10^{-6}$) и являлись сильными мутаторами. Среди изолятов *P. aeruginosa* (HeMB) сильных мутаторов выявлено не было. 59% гипермутабельных изолятов *P. aeruginosa* (MB) имели атипичный фенотип, в том числе были устойчивыми к фагам, 65% являлись множественнорезистентными и 71% были способны образовывать биопленки.

Показаны характерные фенотипические особенности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с MB. Выявлены изоляты без пигмента (23%), а также медленно растущие (8%) и изоляты с мукоидным фенотипом (27%).

Среди изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих муковисцидозом не обнаружено сильных мутаторов и штаммов атипичного фенотипа. Что свидетельствует о высокой адаптационной способности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с MB, и сложностью при их идентификации.

ГЛАВА 4. Молекулярно-генетические характеристики изолятов *Pseudomonas aeruginosa*

4.1 Молекулярно-эпидемиологический мониторинг ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, у пациентов с МВ.

Для изучения генетического разнообразия штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ, было генотипировано методом *RAPD-PCR* 233 штаммов, выделенных из нижних дыхательных путей 151 больного (116 детей и 35 взрослых) с 2005-2022гг. Выявлено 145 различных кластера возбудителя хронической синегнойной инфекции у больных муковисцидозом. У 21 (14) % пациентов высевали *P. aeruginosa* таких генотипов, которые встречались и у других больных МВ с синегнойной инфекцией (Таблица 11). У 86% пациентов выделяли генотипы, не встречающиеся у других больных, собственные генотипы.

Таблица 11 – Описание *RAPD*- генотипов

Кол-во штаммов, исследованных методом <i>RAPD</i>	233
Кол-во <i>RAPD</i> - генотипов	145
Кол-во больных, изоляты от которых охарактеризовали методом <i>RAPD</i>	151
Кол-во больных, у которых штаммы одинаковые по генотипу, различные по фенотипу	40
Кол-во больных, у которых штаммы (из одного посева) различные по генотипу	2
Кол-во больных, у которых генотипы уникальные/неуникальные	130/21

Методом *MLST* определены 20 различных сиквенс-типов среди отобранных штаммов от пациентов из разных регионов Российской Федерации в процессе мониторинга: ST233, ST235, ST245, ST273, ST274, ST281, ST381, ST390, ST575, ST612, ST667, ST794, ST 803, ST1050, ST1074, ST2123, ST2390, ST3993, ST4037, ST4038 (таблица 12). Анализ данных *MLST* и *RAPD-PCR* показал, что наибольшее распространение получили два сиквенс-типа: ST 235 – 7 областей РФ (Башкирия, Белгородская обл., Красноярский край, Московская обл., Оренбургская обл., Ставропольский край, Чувашия), ST 274 – 5 областей (Красноярский край, Костромская обл., Московская обл., Самарская обл.,

Челябинская обл.) ST 794 – 2 региона РФ (Красноярский край, Московская обл.), которые можно определить как эпидемически значимые для пациентов с МВ в РФ.

Таблица 12 – Географическое распространение сиквенс-типов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом в России.

ST	Всего штаммов данного сиквенс-типа	Области	Число штаммов
233	2	Воронежская обл.	2
235	21	Башкирия	2
		Белгородская обл.	1
		Красноярский край	2
		Ставропольский край	6
		Чувашия	2
		Москва и МО	6
245	2	Красноярский край	2
273	2	Москва и МО	2
274	5	Красноярский край	1
		Костромская обл.	1
		Москва и МО	1
		Самарская обл.	1
		Челябинская обл.	1
281	1	Тульская обл.	1
381	10	Красноярский Край	10
390	6	Тульская обл.	6
575	4	Москва и МО	2
		Брянская обл.	2
612	4	Белгородская обл.	3
		Москва и МО	1
667	1	Воронеж. обл.	1
794	4	Москва и МО	4
803	2	Р. Чувашия	2
1050	8	Москва и МО	8
1074	2	Тюменская обл.	2
2123	2	Москва и МО	2
2390	4	Москва и МО	4
3993	2	Р. Чувашия	2
4037	2	Красноярский Край	2
4038	5	ЯНАО	2

В международную базу PubMLST были внесены сведения о 31 изоляте *P. aeruginosa*, выделенном от больных МВ на территории РФ. 3 новых сиквенс-типа *P. aeruginosa*, выделенные от пациентов МВ, отсутствовали ранее в международной базе PubMLST и были зарегистрированы под новыми номерами ST 4037, ST 3993, ST 4038. Последовательность нуклеотидов седьмой аллели, гена *trpE* *P. aeruginosa* ST 3993 оказалась новой и впервые зарегистрирована в базе как *trpE* 317. Уникальные генотипы ST 4037, ST 3993, ST 4038 были выделены у пациентов с МВ Красноярского края, Чувашии и Ямало-ненецкий автономного округа (ЯНАО), соответственно.

4.2 Анализ распространения в мире 17 сиквенс-типов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов МВ, по международной базе

Проведен анализ распространения 17 сиквенс-типов *P. aeruginosa*, выявленных у пациентов МВ, с использованием базы PubMLST [133].

В базе PubMLST представлены данные о 220 изолятах *P. aeruginosa*, относящихся к эпидемически значимому ST 235, выделенных из крови, мокроты, уха, перитонеальной жидкости, воды, из центрального венозного катетера, при инфекциях мочевыводящих путей и мягких тканей. *P. aeruginosa* ST235 была выявлена в 20 различных странах: России, Беларуси, Сербии, Казахстане, Бразилии, Китае, Мексике, Индии, Сингапуре, Австралии, Венгрии, Нигерии, Норвегии, Франции, Кот-д'Ивуар, Перу, Малазии, ЦАР, Великобритании, Польши. Этот сиквенс-тип был выявлен также у домашних животных (кошек, собак) в Японии и в Австралии.

28 изолятов *P. aeruginosa* ST 233 были идентифицированы в 8 различных странах (Великобритании, Польше, Франции, Мексике, Норвегии, Нигерии, Австралии, Кот-д'Ивуар). *P. aeruginosa* данного сиквенс-типа выделяли из мокроты, крови, а также при инфекции мочевыводящих путей и инфекции мягких тканей.

ST 273 был широко распространен в Польше, а также встречался во Франции и Австралии. В базу PubMLST внесено 78 изолятов (2000-2015 гг) о *P. aeruginosa* ST 273, которая была выявлена из воды, крови, мокроты, бронхиального лаважа и при инфекциях мочевыводящих путей.

P. aeruginosa ST 281 был выделен из крови у пациента в Испании.

ST 245 встречался в Австралии, Франции и Польше. *P. aeruginosa* ST 245 была выделена из крови, ожоговой раны и мокроты больных (6 изолятов).

ST 274 был распространен в 9 странах: Австралии, Малазии, Франции, России, Австрии, Испании, Бразилии, Сенегале, Эфиопии. *P. aeruginosa* этого генотипа была выделена из воды, крови, бронхиального лаважа, мокроты, из окружающей среды, при отите у домашних животных. 76 изолятов зарегистрировано в базе MLST.

P. aeruginosa ST 381 выделяли в 7 странах: Австралии, Франции, Испании, России, Польше, Бразилии, Малазии и Кот-д'Ивуар из крови, мокроты, воды, при инфекциях мягких тканей и мочевыводящих путях, при исследовании больничных сточных вод. 24 изолята внесено в базу.

ST 390 встречался в Канаде, Польши, Франции. *P. aeruginosa* данного сиквенс-типа была высеяна из крови, мокроты и из окружающей среды. В базе данных зарегистрированы 4 изолята.

ST 575 встречался в Венгрии и Нидерландах.

При исследовании мокроты больных в Нидерландах и Австралии была выделена *P. aeruginosa* ST 612.

P. aeruginosa ST 794 встречался в Хорватии, России, Польше и Австралии. *P. aeruginosa* этого сиквенса была выделена из мокроты, при инфекции мочевыводящих путей, из окружающей среды (вода реки Квинсленда) (7 изолятов).

8 изолятов *P. aeruginosa* ST 803 выделяли в Австралии из крови, мокроты и БАЛ, и 1 изолят из крови пациента в Бразилии.

P. aeruginosa ST 1074 был выявлен в Австралии и Хорватии, ST 2123 во Франции, ST 2390 в Германии.

Данные о ST 667 в базе PubMLST отсутствуют.

В базе PubMLST кроме ST 235 эпидемически значимыми генотипами указываются также ST 273, ST 274.

Таким образом, проведенный анализ изолятов, внесенных в международную базу данных MLST показал, что 35% сиквенс-типов (7 из 20 типированных нами) встречались у больных с МВ и в других странах, т.е. имели глобальное распространение. *P. aeruginosa* ST 235 выделяли из мокроты и бронхиального лаважа у пациентов с МВ в Австралии, Казахстане и России. ST 274 был выявлен в 3-х странах у больных с МВ: в России, Австралии и Испании. ST 245, 273, 381, 803, 1074 были типированы у пациентов с МВ в Австралии. В РФ у больных МВ были выявлены ST 1050 (Московская область), ST 794 *P. aeruginosa* в Ставропольском Крае, в Северной Осетии и Московской области. Изоляты *P. aeruginosa* ST 233, 245, 612 были выделены у детей в двух педиатрических стационарах г. Москвы в 2012-2016 гг. [137].

Анализ фенотипических свойств 20 сиквенс-типов (Таблица 13) показал, что 72% изолятов *P. aeruginosa* характеризовались множественной антибиотикорезистентностью (МР). Изоляты с сильной мутабельностью (18%) и высокой способностью к пленкообразованию (39%) встречались среди различных сиквенс-типов. Также для изолятов данных сиквенсов были характерны различные пигменты: пиовердин (42%), пиоциананин (9%), а без пигмента (17%). Однако пигмент пиомеланин мы наблюдали только у изолятов, принадлежащих к ST 1050, которые были выделены от одного пациента.

Микробиологический мониторинг с использованием бактериологических и молекулярно-генетических методов показал, что у пациентов с МВ могут одновременно присутствовать различные фенотипы одного генотипа *P. aeruginosa*, а также до трех различных генотипов одновременно. У 22% (32) больных высевали 2 и более различных по фенотипу изолятов *P. aeruginosa*. У

7% (10) пациентов высевали из одного образца биологического материала разные по генотипу изоляты *P. aeruginosa* (рисунок 12). Например, у больного П. выселили 4 изолята *P. aeruginosa* (439-1, 439-2, 439-3, 439-4), которые отличались по пигменту, чувствительности к антибиотикам и фагам, способности образовывать биопленки, гипермутабельности и в результате типирования были отнесены к 3 различным кластерам (таблица 14).

Таблица 13 – Фенотипические свойства различных сиквенс-типов *P. aeruginosa* MB.

ST	№ штамма	Название пигмента	MP ¹	Чувствительность к фагам			Способность к пленкообразованию	Мутабельность
				I	II	III		
233	7Л	пиовердин	–	1	1	1	высокий	сильный
233	8Л	без пигмента	+	1	3	3	средний	сильный
245	341	пиовердин	+	3	1	1	средний	гипомут ²
245	443	пиовердин	+	3	2	1	низкий	немутаб ³
235	38	без пигмента	+	1	1	1	низкий	немутаб
235	146-1	пиовердин	+	1	1	3	высокий	нормо ⁴
235	146-2	пиовердин	+	1	1	1	средний	слабый
235	167	пиовердин	+	2	1	1	средний	сильный
235	13	пиовердин	+	3	2	2	средний	немутаб
235	36-1	оксифеназин	+	2	2	2	высокий	немутаб
235	36-2	пиовердин	+	1	1	1	высокий	немутаб
235	48в	пиорубин	+	1	1	1	низкий	гипомут
235	333	пиовердин	+	2	2	2	высокий	гипомут
235	390	оксифеназин	+	2	1	3	высокий	немутаб

235	420	пиовердин	+	2	1	2	высокий	нормомут
235	85B	без пигмента	+	1	1	1	высокий	гипомут
381	430-1	пиовердин	+	2	1	2	высокий	сильн
381	430-2	пиовердин	+	1	1	1	низкий	гипомут
381	430-3	пиорубин	+	1	1	1	низкий	гипомут
390	19	пиоцианин	–	3	2	1	средний	немутаб
390	33	пиоцианин	+	2	1	1	средний	немутаб
390	164	оксифеназин	+	3	3	3	высокий	немутаб
390	33-1B	без пигмента	+	1	2	2	низкий	гипомут
390	33-2B	пиовердин	+	1	1	2	средний	сильн
505	346	пиовердин	+	1	2	3	средний	гипомут
505	442	пиорубин	+	1	1	1	средний	немутаб
575	106	пиорубин	–	2	3	3	средний	немутаб
575	230	пиовердин	+	2	1	1	низкий	гипомут
575	39B	пиорубин	+	1	1	1	высокий	немутаб
575	44B	пиоцианин	+	1	1	1	высокий	гипомут
612	287	немутаб	–	2	2	2	высокий	немутаб
612	79-1	пиорубин	+	1	1	1	низкий	немутаб
612	79-2	без пигмента	+	1	1	3	высокий	немутаб
3993	122	пиоцианин	–	3	3	3	низкий	слабый
3993	76-1	пиорубин	–	3	3	3	средний	сильный
667	7B	оксифеназин	–	3	2	3	высокий	нормомут
794	231-1	пиоцианин	+	2	1	1	низкий	гипомут
794	231-2	пиоцианин	+	2	1	1	средний	гипомут
794	277	пиовердин	–	2	2	1	средний	гипомут

794	387	пиовердин	+	2	1	1	низкий	гипомут
803	122-2	пиовердин	+	2	2	3	средний	сильный
803	76-2	без пигмента	+	2	2	2	высокий	гипомут
1050	203	без пигмента	+	3	2	3	низкий	гипомут
1050	203-2	пиомеланин	+	3	1	3	высокий	немутаб
1050	70	пиомеланин	–	1	1	3	высокий	гипомут
1050	159B	пиомеланин	+	1	1	3	средний	гипомут
1074	5	пиовердин	–	3	2	3	низкий	гипомут
1074	307	пиовердин	–	2	2	3	высокий	гипомут
4038	42	без пигмента	–	3	3	3	низкий	сильный
4038	42	без пигмента	–	1	1	1	высокий	сильный
4038	172	пиовердин	+	1	1	1	низкий	сильный
4038	306	пиовердин	–	2	1	2	низкий	гипомут
4038	306	пиовердин	+	2	2	2	высокий	гипомут
2123	115	пиовердин	–	1	1	1	низкий	слабый
2123	126	без пигмента	+	1	1	1	низкий	немутаб
2390	196	пиовердин	–	1	1	1	низкий	гипомут
2390	469	пиовердин	+	1	2	2	высокий	немутаб

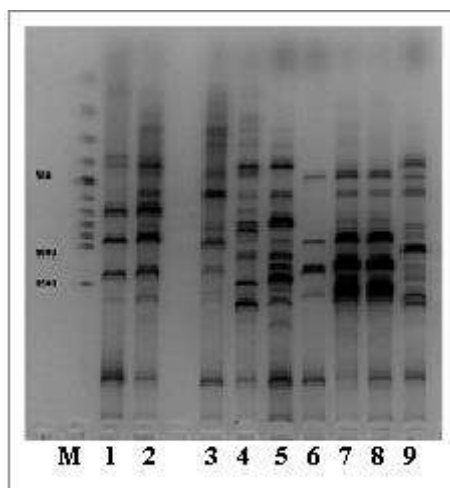
MP¹ – множественная резистентность,

гипомут² – гипомутабельный, немутаб³ – немутабельный, нормо⁴ – нормомутабельный.

1 – резистентный, 2- умеренно-чувствительный, 3 -чувствительный

Микробиологический мониторинг позволил проанализировать генотипы 90 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в динамике от 27 пациентов (Таблица 15). Исследование генетического сходства изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в

динамике проводили сначала методом RAPD-PCR, а затем MLST. У 2 пациентов (пациенты А, С) RAPD-PCR показал наличие двух различных клонов. Однако метод MLST у этих пациентов подтвердил идентичность аллельного профиля (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE*) и принадлежность генотипов к одному сиквенс-типу, у пациента А. - ST1050, у пациента С. - ST390.



6- изолят 439-1, 7-изолят 439-2, 8- изолят 439-3, 9 –изолят 439-4, М – маркер молекулярного веса

Рисунок 12. Генотипически разные изоляты *P. aeruginosa*.

Анализ данных микробиологического мониторинга с использованием молекулярно-генетических методов позволил выявить, что бактерии *P. aeruginosa* длительно персистируют в нижних дыхательных путях у 93 % (25) больных.

Таблица 14 – Фенотипическое разнообразие изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от одного больного.

№ изолята		РАПД-кластеры	Особенности фенотипа	Пигмент	Резис-ть ²	СОБ ³	СГ ⁴	Чувствител. ⁵ к фагам		
								I	II	III
439	-1	79	мукоид ¹	оксифена-зин	МРШ	средн.	НМ	I	I	R
439	-2	80	-	пиовердин	МРШ	низк.	НМ	S	R	R
439	-3	80	-	без пигмента	-	выс.	ГМ	S	R	I

439	-4	81	-	без пигмента	МРШ	выс.	НМ	I	I	I
-----	----	----	---	-----------------	------------	------	----	---	---	---

¹ – особенности фенотипа (мукоид –мукоидный);

² – резистентность (МРШ – множественнорезистентный штамм);

³ – способность образовывать биопленки (средн.-средний, выс.- высокий, низк.-низкий);

⁴ – способность к гипермутабельности (НМ – немутабельный, ГМ - гипомутабельный);

⁵ – чувствительность к фагам: I – поливалентному пибактериофаг, II – интестибактериофагу, III – синегнойному (I – умеренночувствительный, S – чувствительный, R - резистентный).

У 7% (2) пациентов выявили смену сиквенс-типов возбудителя: у больной С. изолят *P. aeruginosa* ST281 сменился на изолят *P. aeruginosa* ST 390, который далее выделяли в течение 16 мес., а у больной Б. изолят *P. aeruginosa* ST233 сменился на изолят *P. aeruginosa* ST667. У пациента Т.Н. по результатам RAPD-PCR генотипы были различные в течение периода наблюдения.

Длительную персистенцию бактерий *P. aeruginosa* наблюдали у 4 пациентов, у больной М одновременно двух генотипов ST3993 и ST803 на протяжении более 4 лет, у пациента Д. – 3 года, у пациентки С-а ST 2390 определяли более 9 лет, а у пациента А. ST1050 выделяли в течение 15 лет (Рисунок 13).

Таблица 15 – Исследование генетического сходства изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в динамике от 27 больных МВ методами RAPD-PCR, MLST, WGS.

№	№ штамма		Пациент	дата посева	Генетическое сходство	Генотип по RAPD	Генотип по MLST /WGS
1	70	Л	А.	10 июн 06	родственные	20	1050
	203	-1		22 ноя 12		20	1050
	203	-2		22 ноя 12		20	1050
	276			22 фев 13		20	1050
	159В			22 апр 16		124	1050
	279В			20 мар 20		124	1050
	3324	-2		27 апр 21		124	1050

	3324	мук		27 апр 21		124	1050
2	7	Л	Б.	12 май 06	схожие	1	233
	8	Л		12 май 06		1	233
	7	В		10 апр 13	различный	83	667
3	146	-1	В.	25 июн 12	родственные	2	235
	146	-2		25 июн 12		2	235
	167			6 июл 12		2	235
	48	В		3 окт 13		2	235
	85	В		29 сен 14		2	235
4	346		В.В.	25 фев 14	родственные	16	4037
	442			30 окт 14		16	4037
5	37	В	Д.	19 авг 13	родственные	26	н/и
	71	1-В		29 авг 14		26	н/и
	71	2-В		29 авг 14		26	н/и
	71	2-В		29 авг 14		26	н/и
	147	В		14 апр 16		26	н/и
6	13	В	Д-а	29 апр 13	родственные	3	235
	36	1-В		19 авг 13		3	235
	36	2-В		19 авг 13		3	235
	36	3-В		19 авг 13		3	235
7	231	-1	И-в	20 дек 12	родственные	4	794
	231	-2		20 дек 12		4	794
	277			22 фев 13		4	794
	387			3 июн 14		4	794
8	3160		К.Е.	21 июл 20	родственные	144	н/и
	3560			25 окт 21		144	н/и
9	287		К-в	13 мар 13	родственные	15	612
	79	1-В		29 сен 14		15	612
	79	2-В		29 сен 14		15	612
10	341		Л-в	25 фев 14	родственные	19	245
	443			30 окт 14		19	245
11	5		Л-л	14 фев 12	родственные	8	1074
	307			29 май 13		8	1074
12	76	-1Л	М-а	10 окт 07	схожие 122-1	9	3993
	76	-2Л		10 окт 07	схожие 122-2	10	803
	122	-1		23 май 12	схожие с 76-1	9	3993
	122	-2		23 май 12	схожие с 76-2	10	803
13	360		П.К.	20 мар 14	родственные	18	381
	431	-1		30 окт 14		18	381
	431	-2		30 окт 14		18	381

	431	-3		30 окт 14		18	381
14	3045		П-в	26 фев 20	родственные	135	н/и
	3396			28 апр 21		135	н/и
15	177	Л	С.	9 фев 07	различный	65	281
	19			27 фев 12	родственные	5	390
	33			7 мар 12		5	390
	164			6 июл 12	схожий с 33-2В	6	390
	33	1-В		31 июл 13	схожие	5	390
	33	2-В		31 июл 13	схожий с 164	6	390
16	196		С-а	13 ноя 12	родственные	45	2390
	469			16 дек 14		45	2390
	3394	2		27 апр 21		45	2390
17	230		С-я	19 дек 12	родственные	7	575
	39	В		22 авг 13		7	575
18	42	-1	С-к	21 мар 12	родственные	11	4038
	42	-2		21 мар 12		11	4038
	172			10 июл 12		11	4038
	306	-1		20 май 13		11	4038
	306	-2		20 май 13		11	4038
19	3230		С-в	16 сен 20	родственные	139	н/и
	3602			24 ноя 21		139	н/и
20	22	1-В	С.Л.	5 май 13	родственные	14	274
	22	2-В		5 май 13		14	274
	67	1-В		27 авг 14		14	274
	67	2-В		27 авг 14		14	274
	67	3-В		27 авг 14		14	274
21	3017		Т-а	13 фев 20	схожие	134	н/и
	3402			13 май 21		134	н/и
22	6	Л	Т.Н.	12 апр 05	различный	48	н/и
	205			22 ноя 12		46	н/и
	232			20 дек 12		53	н/и
23	115		Ф.	22 май 12	родственные	12	2123
	126			31 май 12		12	2123
24	38		Т.	13 мар 12	родственные	23	235
	333			31 янв 14		66	235
25	3547		Х-а	13 окт 21	родственные	145	н/и
	4181			17 янв 23		145	н/и
26	106		Х.	12 май 12	родственные	13	575
	44	В		16 сен 13		13	575
27	339		Ч.	25 фев 14	Схожие	17	381

	430	-1		30 окт 14		17	381
	430	-2		30 окт 14		17	381
	430	-3		30 окт 14		17	381

Особое внимание было обращено на выявление клона *P. aeruginosa* со схожими фенотипическими характеристиками, выделенного от 5 различных

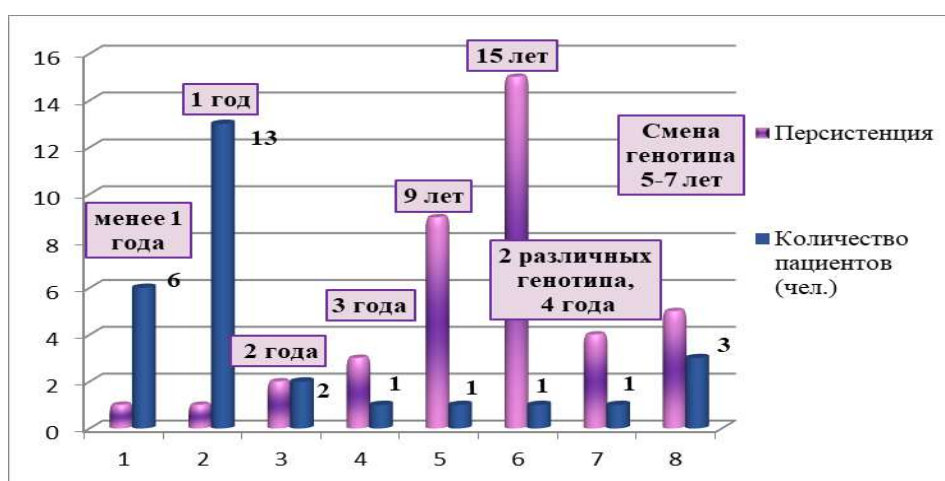


Рисунок 13. Длительность персистенции бактерий *P. aeruginosa* пациентов. Анализ анкетных данных показал, что данные пациенты находились на лечении в РДКБ с марта по июнь 2012 года. Позже был выявлен у двух больных в 2013 году, и у 4-х больных в 2014 году. Для выявления распространения внутрибольничной инфекции провели генотипирование изолятов, выделенных от больных, проходивших лечение в одном лечебном стационаре в одно время. Методом RAPD-PCR была подтверждена их генетическая идентичность (Рисунок 14).

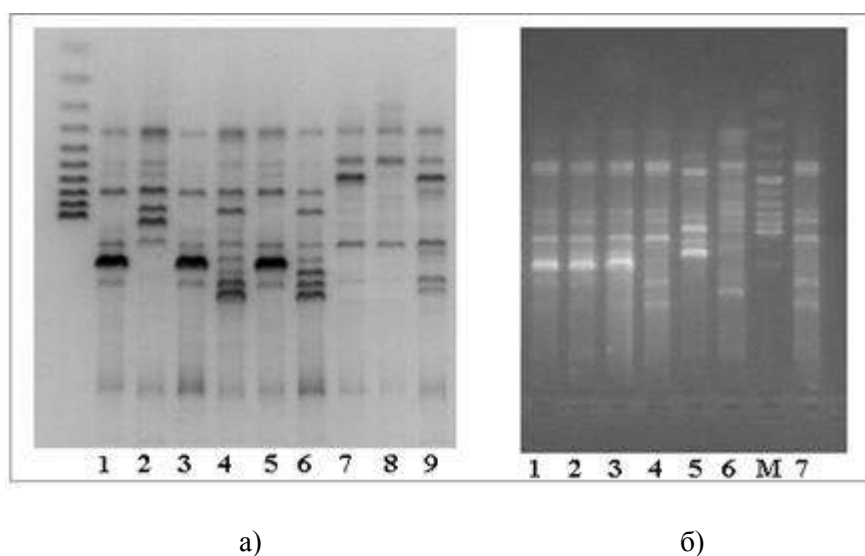
Таблица 16 – Распространение эпидемического штамма *P. aeruginosa* ST235 в 2012 году у 5-пациентов.

№ штамма	ФИО пациента	Дата	Генотип (RAPD)	ST	Резистент-ть*
38	Т Д.	13 март 2012	23	235	МРШ
56	Г В.	3 апрель 2012	23	235	МРШ
108	В В.	14 май 2012	23	235	МРШ

125	-1	Ч А.	29 май 2012	23	235	МРШ
125	-2	Ч А.	29 май 2012	23	235	МРШ
146		В.М.	25 июнь 2012	2	235	МРШ
167		В.М.	6 июль 2012	2	235	МРШ

* – резистентность (МРШ – множественнорезистный)

Далее методом MLST определяли сиквенс-тип. Таким образом, ретроспективно установлено распространение международного эпидемического штамма *P. aeruginosa* ST235 в 2012 году на протяжении 4 месяцев у 5-пациентов, проходивших лечение в РДКБ. Для всех выделенных изолятов ST235 была характерна множественная резистентность к антимикробным препаратам (Таблица 16). Вспышка самопроизвольно закончилась, предположительно это связано с летним периодом и переводом детей на период отпусков на амбулаторное лечение.



а) 1 - изолят 38 (ST 235), 3 – изолят 125-1, 5- изолят 353

б) 1- изолят 56, 2-изолят 108, 3- изолят 125-1, 4 –изолят 146-2, 7 – изолят 167 (ST 235)

Рисунок 14. Электрофореграмма изолятов *P. aeruginosa* ST235.

Был проведен анализ анкетных данных пациентов с МВ, у которых молекулярно-генетическими методами были выявлены различные сиквенс-типы. Показано, что среди пациентов со смертельным исходом, наблюдаемых в течение

11 лет были пациенты с хронической инфекцией легких, у которых выделяли *P. aeruginosa* ST 235, ST390, ST667, ST4037, ST273, ST274, ST575, ST 1074, ST3993 и ST803.

Таким образом, в результате микробиологического мониторинга у пациентов с МВ при ХИЛ были выделены и охарактеризованы 20 сиквенс-типов *P. aeruginosa*. Три новых генотипа ST3993, ST4037, ST4038 ранее не встречались в мире, и впервые зарегистрированы в базе данных MLST (Рисунок 15). Бактерии *P. aeruginosa* новых сиквенсов были выделены у пациентов с МВ Чувашии, Красноярского края, и Ямало-ненецкого автономного округа (ЯНАО), соответственно. С помощью молекулярно-генетических методов установлена персистенция бактерий *P. aeruginosa* длительностью у разных пациентов от 6 мес. до 15 лет 35% установленных сиквенс-типов встречались у больных с МВ в других странах, характеризовались глобальным распространением. А в РФ распространены три сиквенс-типа: ST 235 – 7 областей РФ, ST 274 – 5 областей,

PubMLST

Public databases for molecular typing
and microbial genome diversity

HOME

ORGANISMS

Home > Organisms > *Pseudomonas aeruginosa* > *Pseudomonas aeruginosa* isolates > Search or browse database

Search or browse database

9,753 records returned (5526 - 5550 displayed). Click the hyperlinks for detailed information.

—Bookmark query—

Bookmark

<<<

<

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

>

>>>

Isolate fields							MLST								
id	isolate	aliases	serotype	year	country	source	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	ST	clonal complex
8353	PA 177 L			2007	Russia	Sputum	11	57	1	5	4	4	2	281	
8354	PA 230			2012	Russia	Sputum	11	5	83	2	4	13	7	575	
8355	PA33			2012	Russia	Sputum	39	5	1	3	4	46	56	390	
8356	PA 36-2V			2013	Russia	Sputum	38	11	3	13	1	2	4	235	
8357	PA 5			2012	Russia	Sputum	6	130	1	4	2	4	17	1074	
8358	PA 231			2012	Russia	Sputum	17	22	5	11	3	86	19	794	
8359	PA 8L			2006	Russia	Sputum	16	5	30	11	4	31	41	233	
8375	PA 76-1L			2007	Russia	Sputum	125	5	6	3	4	13	317	3993	
8432	PA 442			2014	Russia	Sputum	6	5	1	11	4	4	2	4037	
8433	PA42-1			2012	Russia	Sputum	28	24	11	3	4	4	19	4038	
8659	PA 341			2014	Russia	Sputum	39	6	12	11	3	15	2	245	
8660	PA 443			2014	Russia	Sputum	39	6	12	11	3	15	2	245	
8661	PA 122-2			2012	Russia	Sputum	15	5	11	3	4	4	7	803	

PubMLST Public databases for molecular typing and microbial genome diversity

HOME ORGANISMS SPECIES ID

Home > Organisms > *Pseudomonas aeruginosa* > *Pseudomonas aeruginosa* isolates > Isolate information

Full information on isolate PA 76-1L (id:8375)

Provenance/primary metadata

id: 8375	continent: Asia
isolate: PA 76-1L	source: Sputum
year: 2007	comments: CF
country: Russia	

Tracking

sender: Ekaterina Siyanova, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health, Russia	curator: Maria Lopez, FRS-CIBIR (E-mail: mlopezm@riojasalud.es)	date entered: 2022-09-22
	update history: 1 update show details	datestamp: 2022-09-22

Рисунок 15. Зарегистрированные изоляты *P. aeruginosa* различных сиквенсов на территории РФ в базе PubMLST [133]

ST794 – 2 региона РФ. Выявлена новая последовательность нуклеотидов седьмой аллели компонента I антранилат-синтазы, гена *trpE* изолята 76-1Л *P. aeruginosa* ST 3993, впервые зарегистрирована в базе как *trpE* 317 (рисунок 14). В 2012 году показана вспышка внутрибольничной синегнойной инфекции, вызванной штаммом ST 235, среди детей больных МВ.

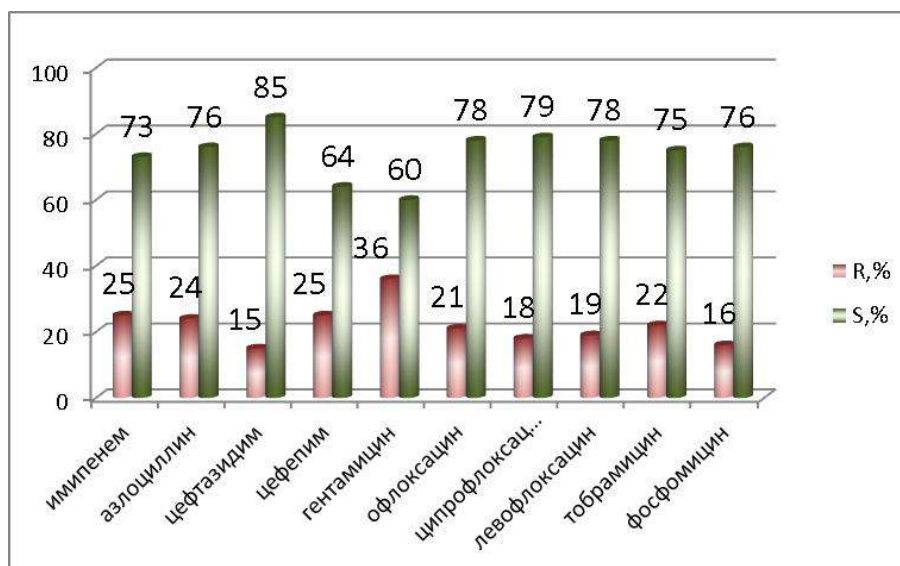
Таким образом, несмотря на проводимую антибиотикотерапию, штаммы длительно сохраняются в дыхательных путях больных МВ, могут передаваться от пациента к пациенту в условиях стационара, что подтверждает необходимость и актуальность нашей работы.

4.3 Мониторинг антибиотикочувствительности изолятов *Pseudomonas aeruginosa* к антимикробным препаратам

В процессе мониторинга была изучена антибиотикочувствительность 472 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ в 2012-2016, 2020-2022 гг. Было исследовано 374 изолята *P. aeruginosa*, выделенных от детей, среди которых

мультирезистентными являлись 43%. Общее количество изолятов, исследованных от взрослых больных, было 98, среди них 61% были мультирезистентными.

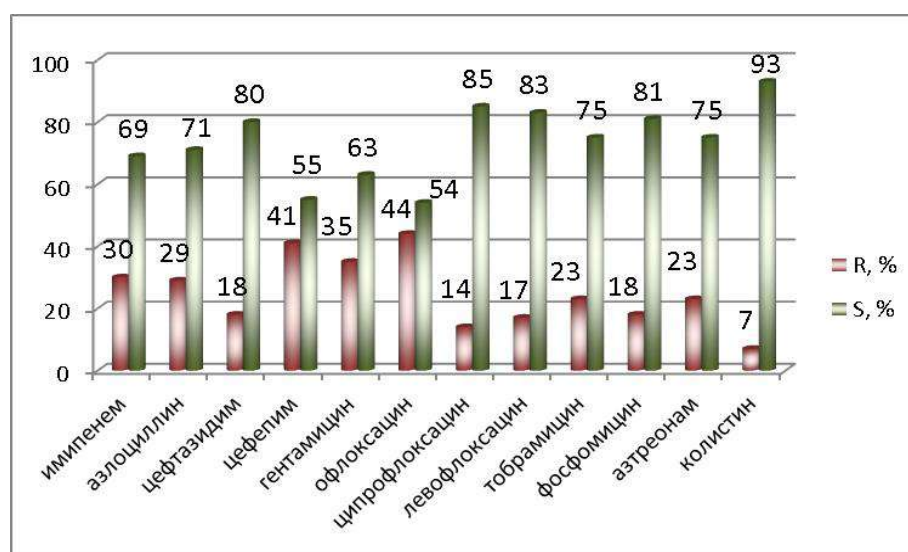
Исследование чувствительности к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa* проводили на момент их выделения и результаты учитывали в соответствии с действующими на тот год рекомендациями [154,155,156,157,169,171,172]. Мониторинг антибиотикорезистентности в течение 10 лет изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ, показан на рисунках 4.5, 4.6, 4.7, 4.8. Анализ 125 антибиотикограмм в 2012-2013-гг продемонстрировал, что 85% штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от детей, проявляли чувствительность к цефтазидиму, 64% - к цефепиму. К фторхинолонам II-III поколения – офлоксацину, цiproфлоксацину и левофлоксацину - были чувствительны 78%, 79% и 78% изолятов, соответственно. Процент чувствительных к аминогликозидам штаммов составил: к тобрамицину - 75%, к гентамицину - 60%. К полусинтетическому пенициллину азлоциллину были чувствительны 76% штаммов *P. aeruginosa*. К имипенему были чувствительны - 73%. Наибольшая резистентность изолятов *P. aeruginosa*, проявлялась к гентамицину и составила 36% (Рисунок 16).



R, % - процент резистентных штаммов, S, % -чувствительных штаммов

Рисунок 16. Чувствительность к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей в 2012-2013-гг.

При исследовании 147 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей в 2015-2016-гг, в список антибиотиков включили полимиксин Е, колистин и азтреонам. 93 % штаммов были чувствительны к колистину (Рисунок 17), к офлоксацину, цiproфлоксацину и левофлоксацину - 85%, 83 % и 83 % изолятов, соответственно. К цефалоспорином III-IV поколения: к цефтазидиму проявляли чувствительность 80% изолятов, к цефепиму – 55%. К тобрамицину процент чувствительных штаммов составил - 75%, к гентамицину - 63%. К азлоциллину



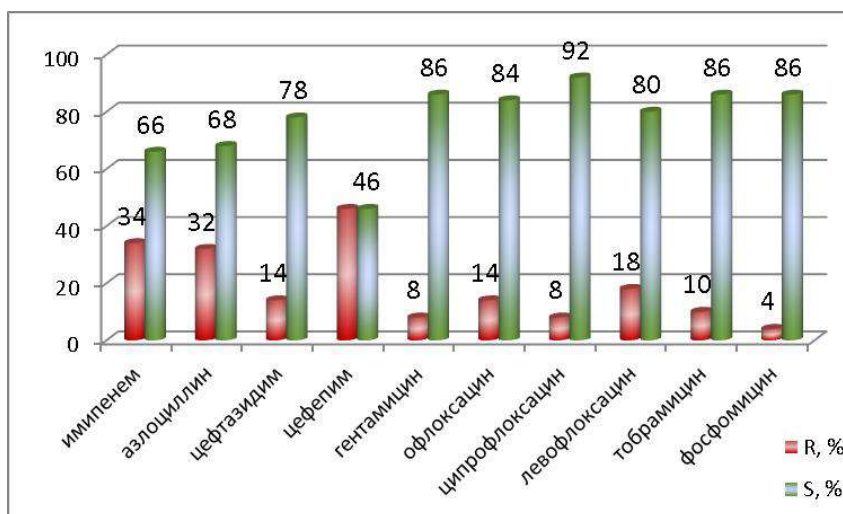
R, % - процент резистентных штаммов, S, % -чувствительных штаммов

Рисунок 17. Чувствительность к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей в 2015-2016 гг.

были чувствительны 71% штаммов *P. aeruginosa*, к имипенему - 69%, к азтреонаму - 75 %. Итак, наибольшая резистентность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в 2015-2016 гг. была к гентамицину, цефепиму и офлоксацину и составила 35%, 41%, 44%, соответственно.

Анализ 50 антибиотикограмм изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых пациентов с МВ в 2012-2013 гг. показал, что 78% штаммов проявляли чувствительность к цефтазидиму, к цефепиму – 46% (Рисунок 18). К фторхинолонам II-III поколения – офлоксацину, цiproфлоксацину и левофлоксацину - были чувствительны 84%, 92% и 80% изолятов, соответственно.

Процент чувствительных штаммов к аминогликозидам (тобрамицину, гентамицину) находился на одинаковом уровне и составил 86%.

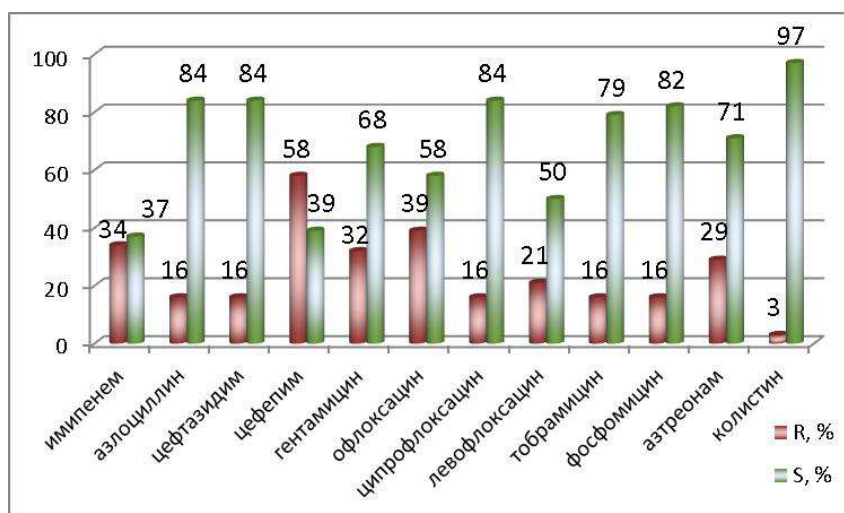


R, % - процент резистентных штаммов, S, % - чувствительных штаммов

Рисунок 18. Чувствительность к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых в 2012-2013 гг.

К полусинтетическому пенициллину азлоциллину были чувствительны 68% штаммов *P. aeruginosa*, к имипенему - 66%. Таким образом, наибольшая резистентность изолятов *P. aeruginosa* была к цефепиму и составила 46%.

При исследовании 38 изолятов *P. aeruginosa* 2015-2016 гг. 97 % штаммов, выделенных от взрослых, были чувствительны к колистину, к офлоксацину, цiproфлоксацину и левофлоксацину - 58%, 84 % и 50 % изолятов, соответственно (Рисунок 19). К цефалоспорином III-IV поколения: к цефтазидиму проявляли чувствительность 84% изолятов, к цефепиму – 39%. К тобрамицину процент чувствительных штаммов составлял - 79%, к гентамицину - 68%, к азлоциллину - 84% штаммов *P. aeruginosa*. К имипенему, к азтреонаму были чувствительны - 37%, 71 % изолятов, соответственно. Наибольшая резистентность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых в 2015-2016 гг. проявлялась к цефепиму, офлоксацину и имипенему, и составила 58%, 39%, 34%, соответственно.



R, % - процент резистентных штаммов, S, % -чувствительных штаммов

Рисунок 19. Чувствительность к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых в 2015-2016 гг.

Антибиотикограммы изолятов *P. aeruginosa*, полученные в 2012-2013 гг. и 2015-2016 гг. от детей и взрослых, показывают нарастание резистентности в различных группах антибиотиков ($p>0.05$). Так, диаграммы антибиотикорезистентности штаммов, выделенных от взрослых 2015-2016 гг. показывают увеличение количества резистентных штаммов к фторхинолонам II-III поколения: к офлоксацину с 14% до 39%, к ципрофлоксацину с 8% до 16%, к левофлоксацину с 18 до 21%. К цефепиму произошло изменение резистентности до 58% изолятов. Отмечается снижение чувствительности к имипенему до 37% штаммов. А в диаграммах изолятов, выделенных от детей, процент резистентных изолятов *P. aeruginosa* составил к цефепиму 25% (2012-2013гг), 41% (2015-2016 гг).

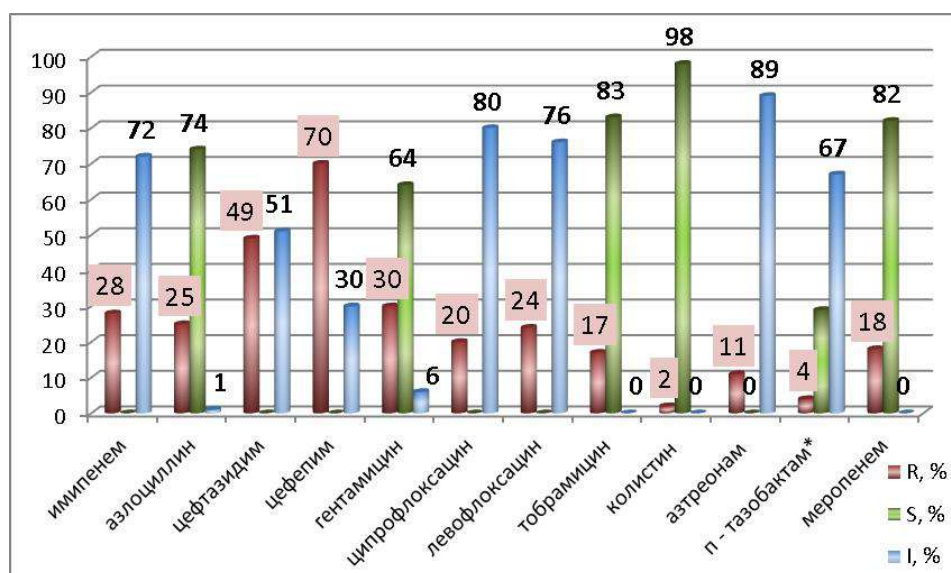
В последующие годы показатели и категории чувствительности неоднократно пересматривались и в 2021 году были утверждены новые названия клинических категорий чувствительности и добавлена категория «чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата» [157].

На современном этапе мониторинг антибиотикочувствительности штаммов, выделенных от детей в 2021-2022 году, проводили с использованием расширенного ряда антибиотиков, включая пиперациллин/тазобактам и

меропенем. Анализ данных 102 антибиотикограмм показал, что выделенные штаммы *P. aeruginosa* проявляли наибольшую резистентность к цефалоспорином III-IV поколения. Резистентность к цефепиму и цефтазидиму наблюдали у 70% и 49% штаммов соответственно (рисунок 20). Процент чувствительных к аминогликозидам штаммов составлял: к тобрамицину - 83%, к гентамицину - 64%.

К полусинтетическому пенициллину азлоциллину были чувствительны 74% штаммов *P. aeruginosa*, к колистину - 98%. К фторхинолонам II-III поколения - ципрофлоксацину и левофлоксацину - были чувствительны при увеличенной экспозиции 80% и 76% изолятов соответственно. К карбапенемам – меропенему были чувствительны 82% изолятов, к имипенему чувствительны - 72%. К азтреонаму проявляли чувствительность при увеличенной экспозиции – 89%, к пиперациллин/тазобактаму – 65%.

Результаты исследования 55 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых в 2021-2022 гг., показал, что они проявляли наибольшую резистентность к цефалоспорином III-IV поколения, резистентность к цефепиму и цефтазидиму наблюдали у 100% и 64% штаммов соответственно (рисунок 21).

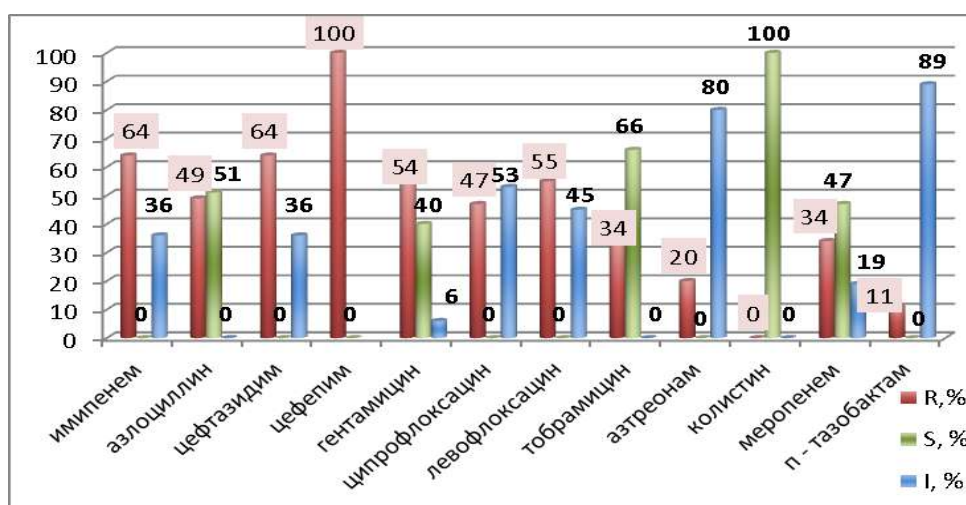


*- пиперациллин/тазобактам

R, % - процент резистентных штаммов, S, % -чувствительных штаммов, I-чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата и означает, что экспозиция препарата должна быть увеличена

Рисунок 20. Чувствительность к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей в 2021-2022 гг.

Процент чувствительных к аминогликозидам штаммов составлял: к тобрамицину - 66%, к гентамицину - 40%, к полусинтетическому пенициллину азлоциллину -51%. К колистину были чувствительны 100% штаммов *P. aeruginosa*. К фторхинолонам II-III поколения - ципрофлоксацину и левофлоксацину - были чувствительны при увеличенной экспозиции 53% и 45% изолятов соответственно. К карбапенемам: меропенему и имипенему были резистентны 34% и 64% изолятов, соответственно. К азтреонаму проявляли чувствительность при увеличенной экспозиции – 80%, к пиперациллин/тазобактаму – 89%.



*- пиперациллин/тазобактам

R, % - процент резистентных штаммов, S, % -чувствительных штаммов, I-чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата и означает, что экспозиция препарата должна быть увеличена

Рисунок 21. Чувствительность к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых в 2021-2022 гг.

Таким образом, на современном этапе результаты исследования чувствительности изолятов, выделенных от детей больных МВ, показали, что наибольшую эффективность проявили антимикробные препараты меропенем, тобрамицин и колистин. А у взрослых более эффективными были азлоциллин, меропенем, тобрамицин. Колистин также проявил высокую эффективность в отношении изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых, а к азтреонаму и пиперациллин-тазобактаму изоляты, были чувствительны при увеличенной экспозиции (Рисунки 20, 21). Было показано, что наибольший процент изолятов от детей и взрослых были чувствительны к колистину 98% и 100%, соответственно.

Мониторинг антибиотикочувствительности изолятов *P. aeruginosa* позволил изучить изменение показателей антибиотикочувствительности при длительной персистенции бактерий у больных МВ. В таблице 17 представлены 90 антибиотикограмм штаммов *P. aeruginosa* 28 различных генотипов, выделенных от 27 пациентов в динамике с периодичностью от 2 месяцев до 14 лет.

Таблица 17 – Изменения резистентности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от 27 больных МВ в динамике.

[illegible]

3	146	-1	В.	25 июн 12	S	S	S	S	R	S	S	R	R	2	235
	146	-2		25 июн 12	S	S	S	S	R	R	I	R	R	2	235
	167			6 июл 12	R	I	S	S	R	R	R	R	R	2	235
	48	В		3 окт 13	S	S	R	S	R	R	R	R	R	2	235
	85	В		29 сен 14	S	R	S	S	R	R	R	R	R	2	235
4	346		В.В	25 фев 14	S	R	S	R	S	S	I	I	S	16	4037
	442			30 окт 14	R	S	R	R	S	R	R	S	S	16	4037
5	37	В	Д.	19 авг 13	S	S	S	I	S	S	S	S	S	26	н/и
	71	1-		29 авг 14	S	R	I	S	S	S	S	S	S	26	н/и
	71	2-		29 авг 14	S	S	R	S	I	S	S	I	S	26	н/и
	71	2-		29 авг 14	S	S	R	S	I	S	S	I	S	26	н/и
	147	В		14 апр 16	S	S	S	R	R	R	S	R	S	26	н/и
6	13	В	Д-а	29 апр 13	R	S	S	R	S	S	S	S	S	3	235
	36	1-		19 авг 13	R	S	S	R	S	S	S	S	S	3	235
	36	2-		19 авг 13	R	S	S	I	S	S	S	S	S	3	235
	36	3-		19 авг 13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3	235
7	231	-1	И-В	20 дек 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4	794
	231	-2		20 дек 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4	794
	277			22 фев 13	S	S	S	S	S	R	S	S	S	4	794
	387			3 июн 14	S	S	S	R	S	S	S	S	S	4	794
8	3160		К.Е	21 июл 20	I	S	I	R	S	I	I	I	S	144	н/и
	3560			25 окт 21	I	S	I	R	S	I	I	I	S	144	н/и
9	287		К-В	13 мар 13	S	S	S	S	S	S	S	I	S	15	612
	79	1-		29 сен 14	R	R	S	S	I	S	S	S	S	15	612
	79	2-		29 сен 14	S	S	S	R	S	S	S	R	S	15	612
10	341		Л-В	25 фев 14	R	R	R	R	S	S	S	S	S	19	245
	443			30 окт 14	S	S	R	R	S	S	S	S	S	19	245
11	5		Л.	14 фев 12	S	S	S	R	S	S	S	S	S	8	1074
	307			29 май 13	R	S	S	I	I	S	S	S	S	8	1074
12	76	-	М.	10 окт 07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	9	3993
	76	-		10 окт 07	R	R	R	R	S	S	S	I	S	10	803
	122	-1		23 май 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	9	3993
	122	-2		23 май 12	R	R	S	R	S	S	S	S	S	10	803
13	360		П.К.	20 мар 14	S	S	I	S	S	S	S	S	S	18	381
	431	-1		30 окт 14	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18	381
	431	-2		30 окт 14	S	R	S	S	S	R	R	R	S	18	381
	431	-3		30 окт 14	R	S	S	S	R	S	S	S	S	18	381
14	3045		П-В	26 фев 20	R	S	I	R	R	R	R	R	R	135	н/и
	3396			28 апр 21	R	S	R	R	R	R	R	R	R	135	н/и
15	177	Л	С.	9 фев 07	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65	281
	19			27 фев 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5	390
	33			7 мар 12	S	R	S	R	S	S	S	S	S	5	390
	164			6 июл 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6	390
	33	1-		31 июл 13	S	S	R	S	S	S	S	S	S	5	390
	33	2-		31 июл 13	S	R	R	S	S	S	S	S	I	6	390
16	196		С-а	13 ноя 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	45	2390
	469			16 дек 14	R	S	S	R	R	S	S	S	R	45	2390
	3394	2		27 апр 21	R	S	R	R	S	-	I	I	R	45	2390
17	230		С-я	19 дек 12	R	S	S	S	S	R	R	R	S	7	575

	39	В		22 авг 13	S	R	S	S	S	S	S	S	S	7	575
18	42	-1	С-к	21 мар 12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	11	4038
	42	-2		21 мар 12	S	S	S	R	S	S	S	S	S	11	4038
	172			10 июл 12	S	S	R	S	I	S	S	S	S	11	4038
	306	-1		20 май 13	S	S	S	R	R	S	S	S	S	11	4038
	306	-2		20 май 13	S	R	S	I	R	S	S	S	S	11	4038
19	3230		С-в	16 сен 20	S	I	R	R	R	I	I	I	S	139	н/и
	3602			24 ноя 21	S	I	I	R	S	I	I	R	S	139	н/и
20	22	1-	С.Л.	5 май 13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	14	274
	22	2-		5 май 13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	14	274
	67	1-		27 авг 14	S	S	S	R	S	R	S	R	S	14	274
	67	2-		27 авг 14	R	S	S	I	S	S	S	S	S	14	274
	67	3-		27 авг 14	S	S	S	R	S	R	S	S	S	14	274
21	3017		Т-а	13 фев 20	R	S	I	I	I	I	I	I	S	134	н/и
	3402			13 май 21	R	S	R	R	I	I	I	I	S	134	н/и
22	6	Л	Т.Н.	12 апр 05	S	S	S	S	R	S	S	S	R	48	н/и
	205			22 ноя 12	R	S	S	S	R	S	S	S	S	46	н/и
	232			20 дек 12	R	S	S	R	R	S	S	S	R	53	н/и
23	115		Ф.	22 мар 12	S	S	S	I	S	S	S	S	S	12	2123
	126			31 май 12	S	S	S	S	S	R	I	R	S	12	2123
24	38		Т.	13 мар 12	S	S	R	R	R	R	R	R	R	23	235
	333			31 янв 14	S	S	S	S	R	S	R	S	R	66	235
25	3547		Х-а	13 окт 21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	145	н/и
	4181			17 янв 23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	145	н/и
26	106		Х.	12 май 12	S	S	S	R	S	S	S	S	S	13	575
	44	В		16 сен 13	S	R	I	S	S	S	S	S	S	13	575
27	339		Ч.	25 фев 14	S	S	S	S	R	S	S	S	S	17	381
	430	-1		30 окт 14	S	S	S	S	S	R	R	S	S	17	381
	430	-2		30 окт 14	S	S	R	R	R	S	I	S	I	17	381
	430	-3		30 окт 14	S	S	S	S	R	R	R	R	S	17	381

ПС- полногеномное секвенирование

S – чувствительность, R – резистентность, I- умеренно чувствительный

н/и – на исследовании

При анализе данных, полученных с помощью методов RAPD-PCR, MLST и WGS, показано, что хроническая синегнойная инфекция у 93% (25) пациентов с МВ наблюдали персистенцию бактерий *P. aeruginosa* в респираторном тракте. У трех больных наблюдали смену генотипов изолятов *P. aeruginosa*, (у пациента Т., пациента Б). У пациента С. отмечали смену генотипа ST 281 на ST 390 с последующей персистенцией последнего в течение 17 месяцев.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате персистенции наблюдается изменчивость – штаммы *P. aeruginosa* могут как приобретать

резистентность к широкому спектру антибиотиков, так и терять к одним антибиотикам и приобретать резистентность к другим. Так, у больного В.В. в феврале 2014 г. изолят *P. aeruginosa* был резистентен только к двум антибиотикам (азлоциллину и цефепиму), а уже в октябре 2014 наблюдали устойчивость к пяти антибиотикам: имипенему, цефепиму, цефтазидиму, офлоксацину, цiproфлоксацину. Развитие устойчивости к антибиотикам бактерий *P. aeruginosa* наблюдали у пациента А. в течение 15 лет, в 2006 году штамм *P. aeruginosa* был чувствителен ко всем исследуемым антимикробным препаратам, в 2012 году проявлял устойчивость к двум (азлоциллину и гентамицину), в 2016 году был резистентным к четырем антибиотикам (имипенем, азлоциллину, гентамицину, тобрамицину), а в 2021 году ко всем антибактериальным препаратам, кроме цефтазидима и цiproфлоксацина, к которым данный изолят проявлял чувствительность при увеличенной экспозиции (Таблица 17).

У больного П. в марте 2014 года выделили штамм *P. aeruginosa* ST 381, который был чувствительным к антибиотикам, а через 6 мес. из одного образца мокроты этого пациента выделено 3 фенотипа *P. aeruginosa* ST 381, которые отличались по чувствительности к антибиотикам. Изолят 431-1 был резистентен к офлоксацину, 431-3 к имипенему и гентамицину, Изолят 431-2 к азлоциллину, офлоксацину, цiproфлоксацину, левофлоксацину (Таблица 17). Что может свидетельствовать о мутациях и приобретенных генах антибиотикорезистентности.

Для выявления генов резистентности при персистенции бактерий *P. aeruginosa* в легких больных при ХИЛ были отобраны 9 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от 5 пациентов, и проведено их полногеномное секвенирование. Обнаруженные гены приведены в таблице 18.

Выявлено наличие у 5 секвенированных изолятов (70L, 203-2, 159B, 122-1, 122-2) недавно открытого гена *crpP*, который кодирует состоящий из 65 аминокислот белок – фермент АТФ-фосфотрансфераза, модифицирующий цiproфлоксацин (Таблица 18).

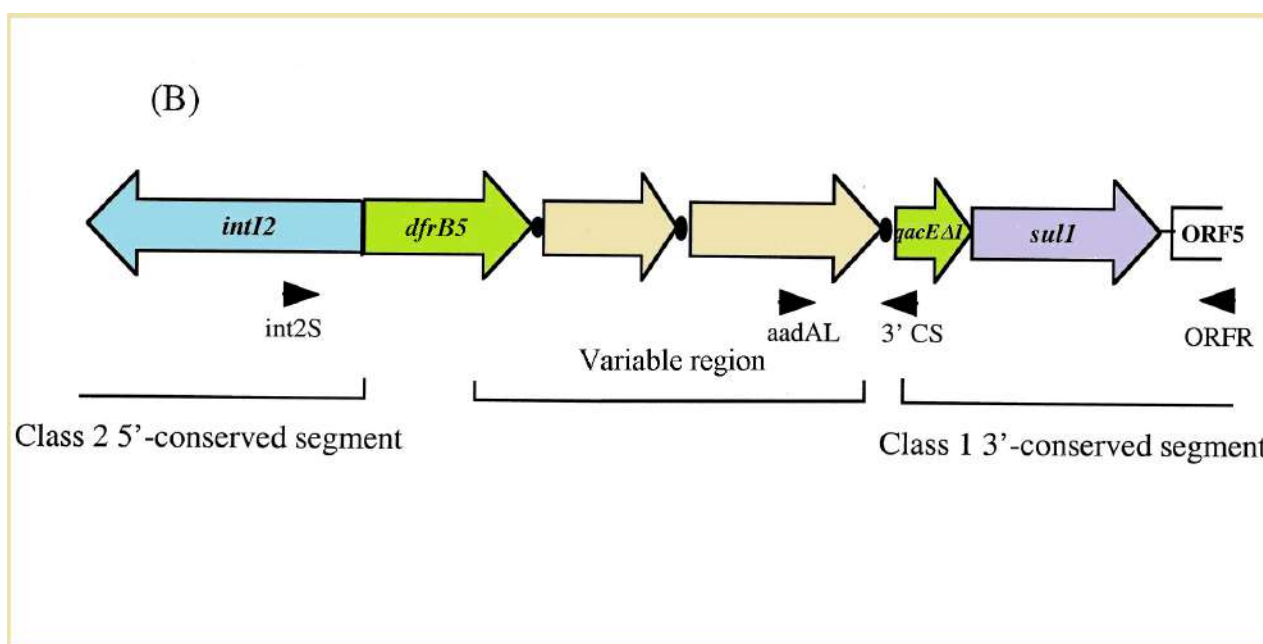
<i>Резистентность к фторхинолонам</i>									
crpP (ципрофлоксацин)	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Резистентность к аминогликозидам</i>									
aph(3')-IIb (гентамицин, нетилмицин, неомицин канамицин)	+	+	+	-	+	+	+	+	+
aac(3)-IIa (гентамицин, тобрамицин)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
aacA6-II	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Резистентность к фосфомицину</i>									
fosA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Резистентность к хлорамфениколу</i>									
catB7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cmlA5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Резистентность к сульфонамиду</i>									
sul 1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Резистентность к триметоприму</i>									
dfrB5	+	+	+	-	-	+	+	-	-

* кл.кислота¹ – клавулановая кислота

Это ген *crpP* был впервые обнаружен в 2018 г. на плазмиде pUM505 в клиническом изоляте *P. aeruginosa* в Мексике [173]. Гены *crpP*, модифицирующие ципрофлоксацин, были идентифицированы также у *P. aeruginosa* на различных мобильных интегративных и конъюгативных элементах, которые часто передаются горизонтально, что указывает на возможность их распространения среди различных клонов *P. aeruginosa* и бактерий других видов, например БЛРС-продуцирующих бактерий порядка *Enterobacterales*, способствуя

появлению других возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью [173,174].

У пациента В. персистировал в легких на протяжении 2 лет изолят 85В, относящийся к эпидемически значимому ST235. Анализ полного генома позволил выявить гены резистентности к беталактамам *blaVim2*, *blaOXA-50*, *blaPDC-14*, к аминогликозидам *aph(3')-IIb*, *aadA6*, а также к фосфосфомицину - *fosA*, фениколу - *catB7*, *cmlA5* (efflux_MFS_transporter). Так же было выявлено, что изолят *P. aeruginosa* 85В приобрел мобильный элемент интегрон 2 класса (class B) с входящими в него генами *sul1*, *dfrB5*, определяющими лекарственную устойчивость к сульфонамиду и триметоприму, и геном *qacEdelta1* с устойчивостью к ЧАС (Рисунок 22), входящими в состав ДС.



5'-conserved segment - 5' консервативный участок сегмента;

3'-conserved segment - 3' консервативный участок сегмента с генами *sulI* и *qacΔE1*,

variable region — варибельная часть сегмента, связанный с интеграцией генных кассет;

orf5 - открытая рамка считывания

Рисунок 22. Приобретенный интегрон с геном *sulI* изолятом 85В *P. aeruginosa*

У пациента Л (изоляты 341 и 443) наблюдали персистенцию ST 245 в течение 6 месяцев. У обоих изолятов были выявлены одинаковые гены антибиотикорезистентности к бета-лактамам (*blaPAO*, *blaOXA-494*, *blaOXA-396*), к фосфомицину (*fosA*), однако поздний изолят 443 отличался наличием гена

aph(3')-IIb, кодирующего резистентность к аминогликозидам (однако антибиотикограмма этого не отражает). У пациента М одновременно наблюдали персистенцию двух генотипов ST 803 (изолят 122-1) и ST 3993 (изолят 122-2) в течение более четырех лет. Оба изолята имели в геноме гены антибиотикорезистентности *blaPAO*, *crpP*, *fosA*, *catB7*, *dfrB5*. У изолята 122-2 ST 803 был обнаружен ген к бета-лактамам *blaOXA-486*, а у изолята ST 3993 был обнаружен ген *blaOXA-396*.

У пациента П. персистировал в течение 6 месяцев ST 381 (изолят 431-2). Это был поздний изолят, резистентный к азлоциллину, офлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину. Полное секвенирование показало наличие генов резистентности *blaOXA-488*, *blaPDC-35*, *fosA*, *catB*, *aph(3')-IIb*.

Анализ геномов изолятов, которые принадлежали к ST1050, выделенных в разное время от пациента А, показал, что у позднего штамма 159В в отличие от ранних появился ген *blaOXA-396*, и не выявлен *blaTEM-104*, выявленный ранее у изолята 203-2.

Полногеномное секвенирование 9 штаммов *P. aeruginosa* выявило, что наиболее распространенными были гены, кодирующие резистентность к аминогликозидам, беталактамам, к фторхинолонам, а также фосфомицину.

Кроме того, были определены гены, обеспечивающие вирулентные свойства *P. aeruginosa*, ответственные за экспрессию токсинов системы секреции 3 типа (*SSTT*). У 8 изолятов присутствовали гены, кодирующие токсины ExoS (70L, 203-2, 159B, 122-1, 122-2, 341, 443, 431-2), у 7 изолятов гены, кодирующие ExoY, ExoT (70L, 203-2, 159B, 122-1, 122-2, 341, 443), у изолята 85B - ген ExoU.

Также были выявлены гены системы эффлюкса, которые относятся к одной из категорий детерминант устойчивости *P. aeruginosa* к антибиотикам. Они выполняют функцию вытеснения антибиотиков из бактериальной клетки и регулируются с помощью кворум-сенсинга (QS). У всех изолятов были определены гены системы эффлюкса семейств MexA-MexB-OpzM, обеспечивающая резистентность к бета-лактамам. Гены системы эффлюкса

семейства (MexX-MexY) были определены у двух изолятов (431-3 и 85B). Гены системы эффлюкса семейства MexC-MexD-OprJ были выявлены у 7 изолятов (70L, 203-2, 159B, 122-1, 122-2, 341, 443), MexE-MexF-OprN - у 8 изолятов (70L, 203-2, 159B, 122-2, 341, 443, 431-3 и 85B). Экспрессия этих двух систем эффлюкса увеличивает устойчивость к ципрофлоксацину и хлорамфениколу, но на разных уровнях. MexC-MexD-OprJ более эффективно вытесняет ципрофлоксацин, а MexE-MexF-OprN вытесняет хлорамфеникол [175].

Таким образом, показано, что на современном этапе у детей наибольший процент штаммов был чувствителен к антимикробным препаратам меропенем (82%), тобрамицин (83%) и колистин (98 %). А у взрослых 100% изолятов были чувствительны к колистину, 66% - к тобрамицину, 51% - к азлоциллину, 47% - меропенему. Мониторинг антибиотикорезистентности в результате исследования фенотипическими методами показал, что в процессе длительной персистенции изоляты способны как приобретать устойчивость к антибиотикам, так и терять. Так, например, у пациента А. бактерии *P. aeruginosa* в течение более 14 лет 10 мес, приобрели резистентность к имипенему, азлоциллину, цефепиму, гентамицину, левофлоксацину. А у больного И. регистрировали сначала приобретение резистентности к цефепиму, а затем спустя год резистентность сменилась на чувствительность к нему, но данный изолят приобрел резистентность к гентамицину.

Сравнение полных геномов изолятов, выделенных в ранние и поздние сроки персистенции, показало, что в процессе развития хронической инфекции в легких бактерии *P. aeruginosa* приобрели гены резистентности к бета-лактамам и аминогликозидам.

Показано, что штаммы *P. aeruginosa*, выделенные от больных МВ имели детерминанты антибиотикорезистентности (*sul1*, *dfrB5*, *qacEdelta1*, *blaVIM2*, *crpP*). Особая эпидемическая значимость таких механизмов резистентности в значительной степени обусловлена тем, что кодирующие их гены, локализованы внутри мобильных генетических элементов. Что указывает на возможность их

быстрого распространения в популяции. А пациенты с МВ могут быть источниками инфекции этих штаммов.

4.4 Исследование генов металло- β -лактамаз *Pseudomonas aeruginosa*

Для пациентов, страдающих муковисцидозом, наибольшую опасность при госпитализациях представляют возбудители внутрибольничных инфекций. В последние годы *P. aeruginosa* является одним из трех ведущих микроорганизмов в этиологической структуре нозокомиальных инфекций, процент выделения данного микроорганизма достигает 19,2% [176]. Повышение уровня роста приобретенной резистентности происходит в том числе за счет металло- β -лактамаз [112].

На первом этапе в 2012-2014 гг. исследование продукции металло- β -лактамаз (М β L) изолятами *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ, проводили диско-диффузионным методом двойных дисков. Было изучено 94 изолята, выделенных от детей и взрослых пациентов с МВ. Продукция М β L была выявлена у 19% изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых (11В, 33В, 63В, 68В, 69В, 92-2В, 107-3В) и у 16% изолятов, выделенных от больных детей МВ (38, 167, 172, 268-1, 268-2, 390, 420, 424). На втором этапе в 2021 году детекцию генов М β L проводили методом ПЦР с 5 парами праймеров: Vim1, Vim2, Imp1, Spm1, Gim1 («Синтол») [163,164]. С помощью данного метода было исследовано 40 изолятов *P. aeruginosa*. Среди которых выявлены гены М β L Vim типа только у 10% изолятов. Продукция М β L у изолята 424 *P. aeruginosa* была выявлена фенотипическим методом (Рисунок 23а). Методом ПЦР были выявлены гены М β L изолятов 167, 268-1, 268-2 и 424 (Рисунок 23б). Наличие продукции М β L фенотипическим методом – расширение зон ингибирования роста штамма 424.

На третьем этапе в 2021-2022 типирование генов M β L групп VIM, IMP и NDM проводили методом ПЦР с гибридизационно - флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» совместно с лабораторией НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи «Анализа генома» под руководством О. Л. Ворониной.

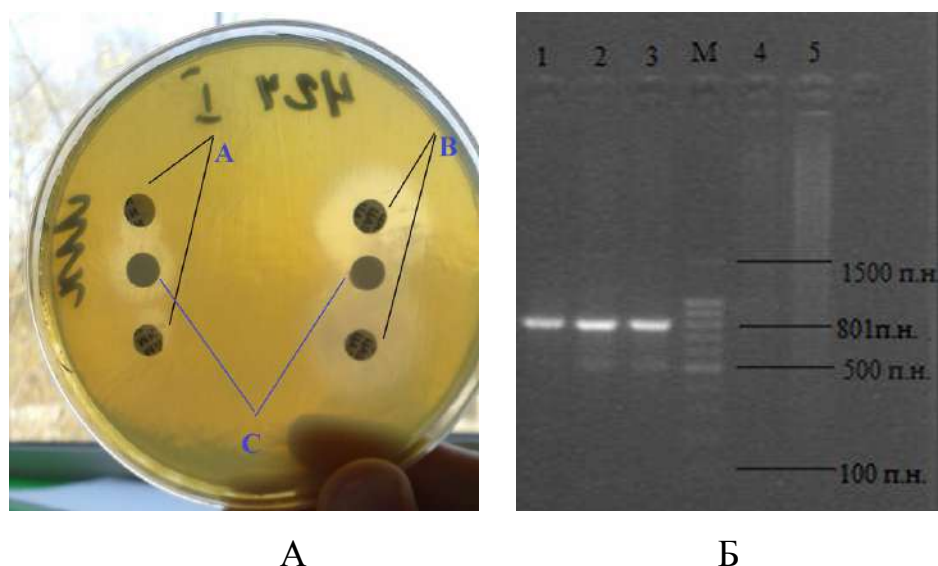


Рисунок 23. Выявление продукции M β L

(а) - метод двойных дисков, (б) - электрофореграмма продуктов амплификации генов Vim-типа, кодирующих M β L, изолятов *P. aeruginosa*

А- диск ИМ имипенемом (10мкг), В- диск ЦАЗ с цефтазидимом (30мкг)

С- диск без маркировки содержит 5 мкл 0,5М ЭДТА

1 - Изолят 424, 2 - Изолят 268-2, 3 - Изолят 268-1, 4 - Изолят 11В, 5 - Изолят 469.

Сначала были изучены 17 изолятов, ранее исследованные методом ПЦР, среди которых только у трех были получены положительные результаты (таблица 19). Методом ПЦР в режиме «реального времени» согласно инструкции производителя АмплиСенс MDR MBL-FL обнаружение генов M β L считалось положительным, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM для флуорофора было определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанного граничного значения (<31). Данным методом из 17 исследованных изолятов у 10 были выявлены гены M β L Vim типа (Таблица 19). Разница в результатах вызывало сомнение.

Полученные результаты могли быть ложноположительные, т.к. положительные контроли в наборе предназначены одновременно для различных видов микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*, *Candida spp.* и др.).

Далее методом ПЦР в режиме «реального времени» исследовали ДНК двух изолятов *P. aeruginosa* NL25, NL26 имеющих по одной копии гена Vim типа. Значение порогового цикла для этих изолятов находилось на уровне Ct 12-13. Так, исходя из полученных данных, нами было принято считать результаты Ct более 13, но менее 31 ложноположительными (таблица 19). В дальнейшем в исследовании методом PCR в режиме «реального времени» в качестве дополнительного контроля непосредственно для изолятов *P. aeruginosa* использовали образцы ДНК NL25, NL26, а также амплификацию проводили при равной концентрации (2 нг/мкл) исследуемых образцов ДНК.

Таблица 19 – Детекция генов MβL 17 изолятов *P. aeruginosa*.

№	№ штамма	ПЦР	Ct	Конц. ДНК, нг/мкл
1	38	-	38,65	29,6
2	268-1	+	6,62	23,8
3	56	-	24,61	23,2
4	108	-	-	45
5	3017	-	27,24	18,26
6	3045-1	-	-	11,2
7	122-2	-	28,9	13,9
8	390	-	22,23	27,2
9	420	-	23,38	33
10	424	+	5,78	22,4
11	824	-	-	34,4
12	896	-	27,96	20,4
13	196	-	32,27	25,6

*Ct – значение порогового цикла ПЦР в режиме «реального времени»,
«Конц. ДНК» -концентрация ДНК, «+» положительный, «-» отрицательный

Всего было изучено 82 изолята *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов: 30 детей МВ и 23 взрослых МВ с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, 20 пациентов (взрослых) ОРИТ и хирургических отделений ГКБ им. Буянова, не больные МВ с острой инфекцией, вызванной *P. aeruginosa* (пневмония, пиелонифрит, острая инфекция мочевыводящих путей, перитонит), проходивших лечение в одно время, а также 5 изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из домашней окружающей среды детей МВ.

Гены MβL VIM типа были обнаружены у 4 изолятов *P. aeruginosa* (10%) от детей с МВ: 167, 268-1, 268-2, 424, и одного изолята 85В, выделенного от взрослого с МВ (4,3%). Среди штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из внешней среды, гены MβL обнаружены не были. Изоляты 167 и 268-1, 268-2, 85В были множественно резистентные к антибактериальным препаратам и относились к эпидемически значимому сиквенс-типу ST235. А изолят 424 был выделен от шестимесячного пациента, у которого при поступлении в стационар *P. aeruginosa* не выделялась из нижних дыхательных путей, а спустя 7 дней был выделен изолят 424 *P. aeruginosa*, характеризующийся множественной резистентностью и имеющий MβL VIM типа. Это может свидетельствовать о колонизации бактериями *P. aeruginosa* легких ребенка в процессе лечения в больнице.

Среди 20 изолятов *P. aeruginosa* HeMB (выделенных от пациентов ГКБ им. Буянова) гены MβL были выявлены у 6 изолятов: 060, 061, 062, 063, 064, 066. Данные изоляты были множественно резистентные. Для исследования генетического родства и выявления внутрибольничной инфекции было проведено генетическое типирование методом RAPD-PCR 10 множественно резистентных штаммов *P. aeruginosa*: 060, 061, 062, 063, 064, 065, 066, 067, 068, 069. Было установлено, что изоляты 060, 062, 063, 064, 066 и 067 были идентичными в RAPD-PCR, т.е. генетически родственными, что говорит о возможном госпитальном происхождении данных изолятов. Исследования сиквенс-типов методом MLST показало, что изолят 061 относится к ST111, а 060, 062, 063, 064,

066 изоляты принадлежат к ST 654, и учитывая результаты, полученные методом RAPD-PCR, изолят 067 так же был отнесен к ST 654.

Таким образом, полученные результаты: обнаружения генов M β L Vim типа у генетически родственных множественно резистентных штаммов, выделенных от пациентов из одного стационара, позволяют сделать вывод о том, что выявление генов M β L Vim типа может являться маркером госпитальной инфекции. Что для больных с МВ представляет особую опасность и требует соблюдения мер по профилактике распространения таких изолятов в госпитальных и негоспитальных условиях, а также контроля обсеменённости внешней среды бактериями *P. aeruginosa*.

Анализ полученных данных показал возможность использования разных методов исследования продукции и детекции генов M β L. В рутинной работе микробиологических лабораторий может быть рекомендовано использование экономически наименее затратного метода двойных дисков. Для лабораторий, имеющих оборудование для ПЦР, можно рекомендовать метод ПЦР в режиме «реального времени». Однако необходимо учитывать, что при использовании набора АмплиСенс MDR MBL-FL значение порогового цикла изолятов *P. aeruginosa* должно превышать 13. Следование протоколу производителя общего для различных видов микроорганизмов показало ложноположительные результаты. Это нужно учитывать при постановке реакции и с помощью других наборов производителей и заранее определить правильный пороговый цикл.

Глава 5. Микрофлора окружающей среды больных МВ вне стационара

5.1 Характеристика условий проживания детей больных МВ

Для характеристики условий проживания больных детей МВ была разработана форма анкеты «Исследование условий быта и микрофлоры внешней среды в домашних условиях проживания пациентов» детей больных МВ совместно с врачами педиатрами-пульмонологами ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (Таблица 20).

Таблица 20 – Анкета «Исследование внешней среды в домашних условиях».

1	ФИО ребенка
2	Дата рождения
3	Возраст ребенка на момент заполнения
4	Микробиологический диагноз
5	Кто проживает с ребенком (указать членов семьи)
6	Кто ухаживает за ребенком (няня, члены семьи и т.д.)
7	Хронические бронхолегочные заболевания у членов семьи (с кем общается ребенок)
8	Есть ли в доме животные, какие
9	Санузел (совмещенный, отдельный и т.д.)
10	Название моющего средства, дез. раствора, применяемых по уходу за небулайзером
11	Время экспозиции моющим средством или дез. раствором.
12	Указать вид стерилизации (Стерилизатор, Стерилизатор с сушкой. Микроволновая печь. Посудомоечная машина и т.д.)
13	Метод сушки (если применимо)
14	Время стерилизации (мин)
15	Название моющего средства для уборки санузла, время экспозиции (если применимо)
16	Название дез. раствора для уборки санузла, время экспозиции

В ходе исследования были проанализированы условия проживания 25 детей и их семей (Рисунок 24). 56% семей, в которых находятся дети, больные МВ, состояли из 4-6 человек. В 96% семей за детьми ухаживают только близкие родственники. Няни участвуют в уходе за детьми в 4% семей. Родственники 20% детей с МВ имели хронические бронхолегочные заболевания. В семьях 44% детей есть домашние животные. В квартирах 52% детей санузел раздельный.

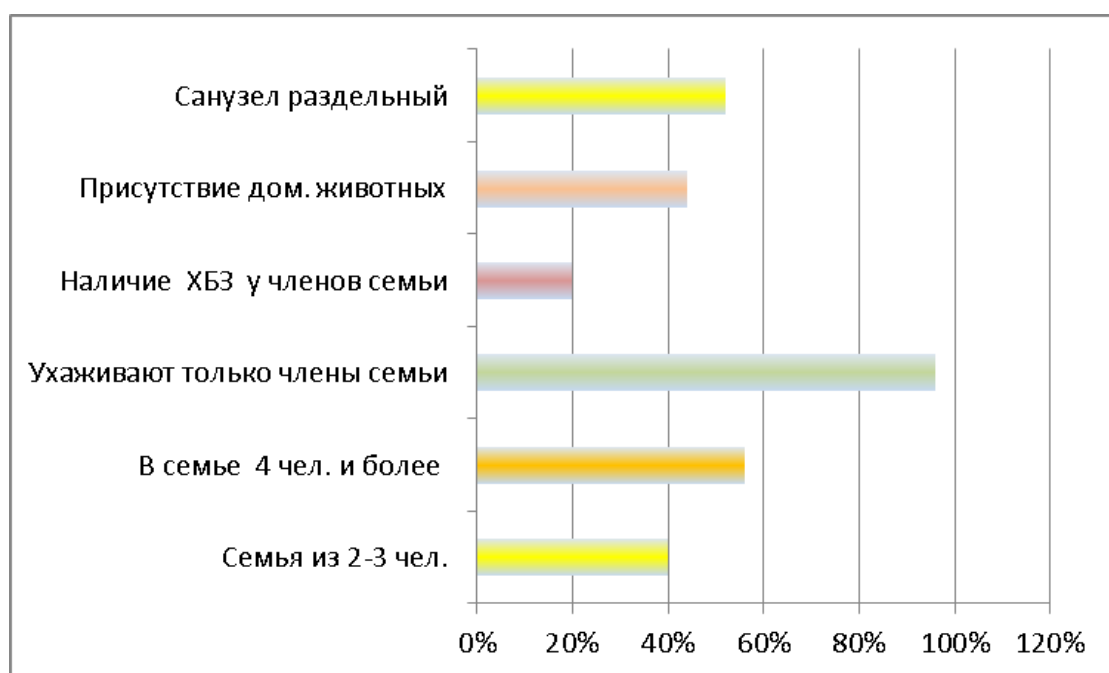


Рисунок 24. Условия проживания детей больных МВ с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*

92% семей для очистки и дезинфекции небулайзеров используют стерилизатор с сушкой. Из них 16% родителей не указали время стерилизации. 8% стерилизуют в течение 10 мин, 52% - от 12 до 20 мин, 16% - от 20 до 30 мин, 8% - от 30 до 40 мин (Рисунок 25). Стерилизатор без сушки используют 4% семей и при этом высушивание проводят на чистых поверхностях. 4% семей кипятят детали небулайзера (используют кипячение) при 100°C в течение 10 мин и после протирают одноразовыми тканевыми салфетками.

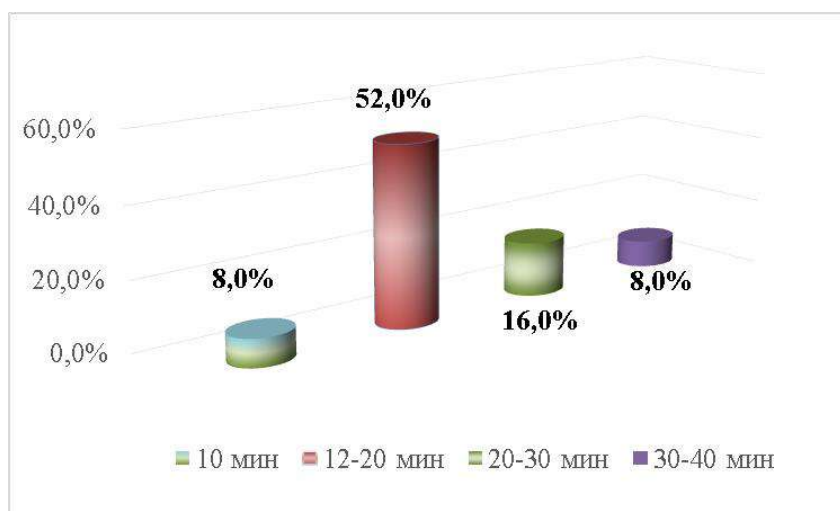


Рисунок 25. Время стерилизации небулайзеров.

20 % семей детей с МВ не использовали моющие или дезинфицирующие средства для ухода за небулайзерами. Аламинолом дезинфицировали небулайзеры 32 % семей. Антибактериальный гель для мытья посуды «Синергетик» для ухода за небулайзером применяли 12% семей. 28% семей уход и очистку небулайзера осуществляли разными средствами. Дезинфицирующие и моющие средства, которые были использованы для очистки небулайзеров в семьях детей больных МВ, представлены на рисунке 26.

В качестве моющего средства для раковин санузла 76% семей использовали «Доместос», 8% - «Санокс». Каждый из следующих средств («Комет», «Мистер Пропер», «Сауфер», «Пемолюкс», «Фаберлик», «Синергетик», «Чистин», «Крышталлин Дезолюкс») применяют 4% семей. 16 % семей мыли санузел несколькими средствами.

Для дезинфекции санузла во время уборки применяли «Доместос» 44% семей, а Аламинол - 12 % (Рисунок 27). 36% семей не выдерживают определенное время дезинфекции. 32% семей дезинфицируют в течение 10-20 минут, 4 % - 30 - 60 мин, 8% семей проводили дезинфекцию более часа. Заливали на ночь сливы раковин только 16% семей.

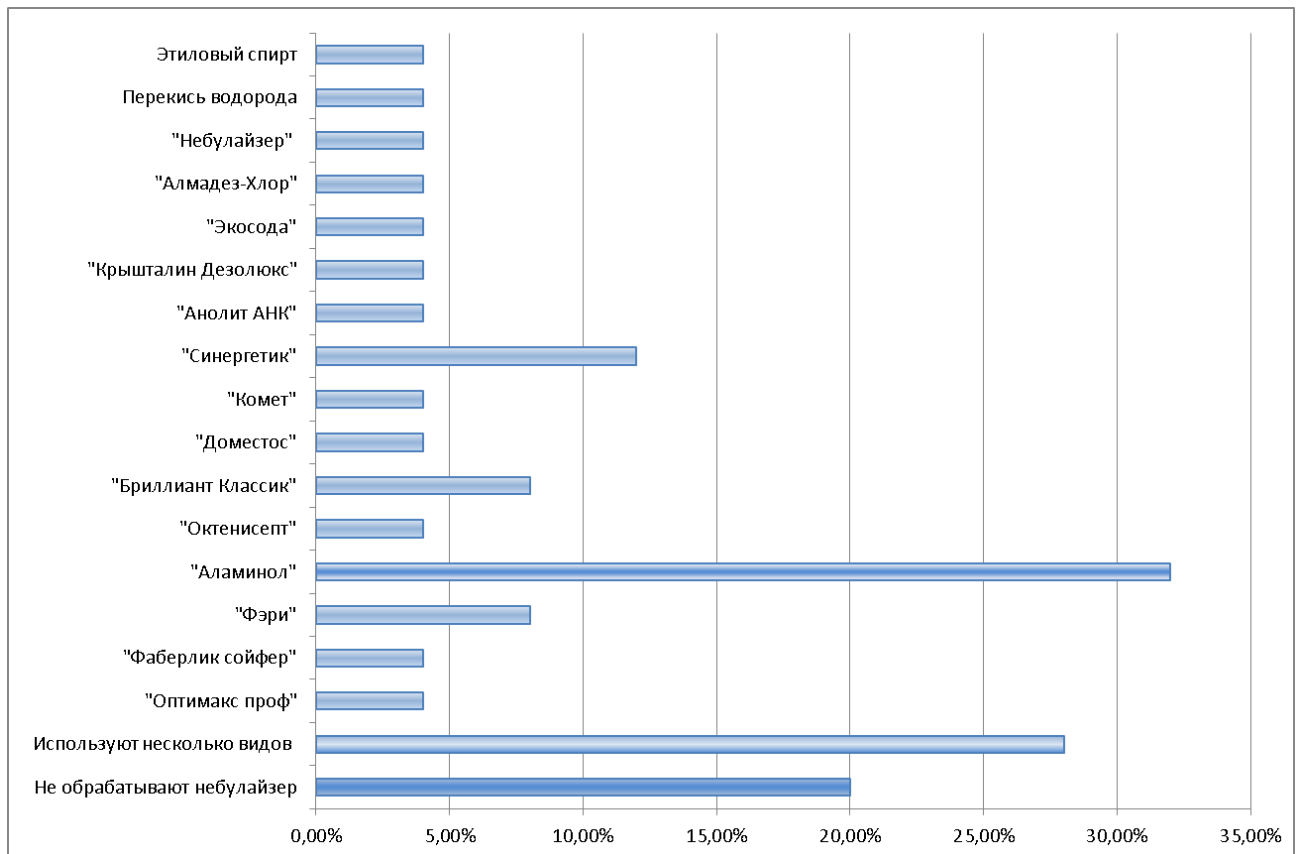


Рисунок 26. Дезинфицирующие и моющие средства, применяемые для ухода небулайзеров, в семьях детей с МВ.

Итак, из проведенного анализа анкетных данных следует, что в связи с использованием различных методов стерилизации и дезинфекции небулайзеров, санузла и наличия сопутствующих хронических инфекций у членов семьи существуют риски инфицирования детей больных МВ. К группе риска можно отнести 5 семей (20%) детей больных МВ, в которых не использовали моющие или дезинфицирующие средства для ухода за небулайзерами и 36% семей, которые не выдерживали строго определенное время дезинфекции раковин. А также к группе риска можно отнести 20% детей, родственники которых имели хронические бронхолегочные заболевания, в том числе у одного родственника (НеМВ) была обнаружена хроническая инфекция легких, вызванная *P. aeruginosa*, вследствие этого нельзя исключить, что данный человек может являться источником инфекции. Поэтому необходимо проводить бактериологические

исследования микрофлоры респираторного тракта не только детей с МВ, но и ближайших родственников, проживающих с ними.

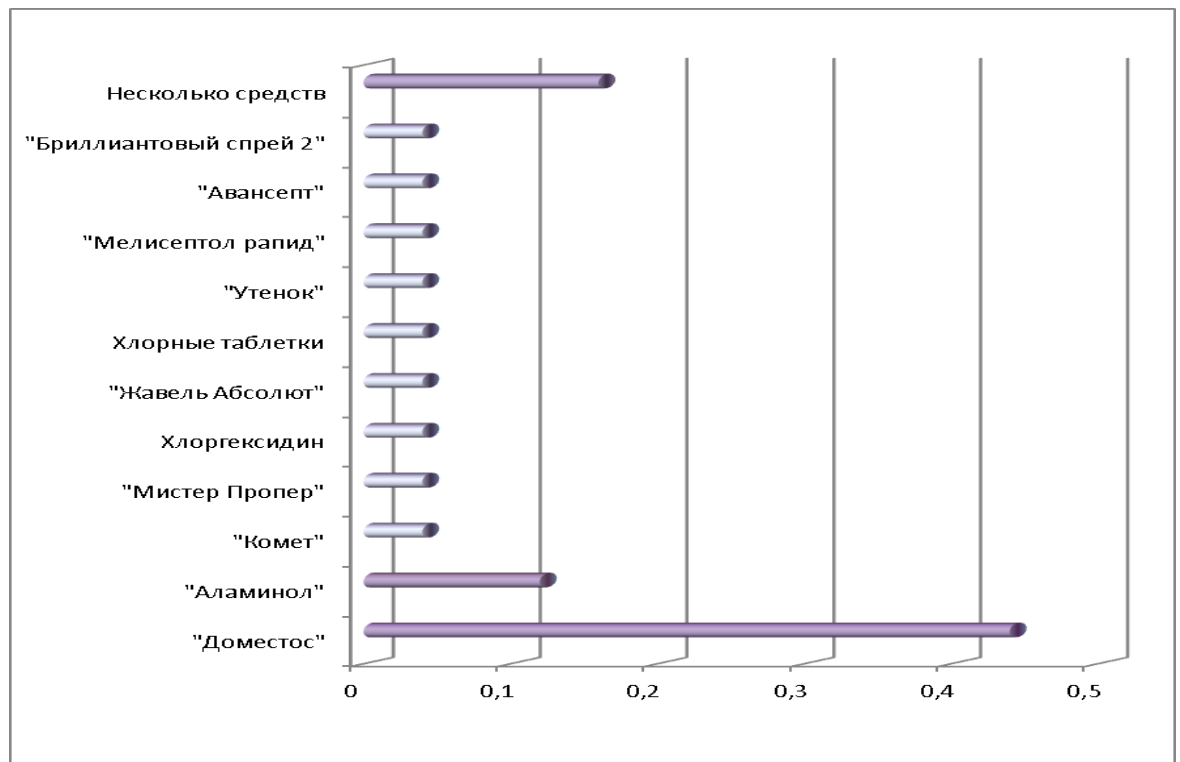


Рисунок 27. Дезинфицирующие и моющие средства, применяемые для обработки раковин санузла.

5.2 Мониторинг микрофлоры внешней среды в домашних условиях проживания пациентов

С целью изучения окружающей среды пациентов с МВ вне стационара были исследованы 247 смыва с объектов домашней среды детей МВ (25 детей, 2 в динамике). Смывы были взяты со следующих объектов: маски небулайзера до ингаляции, после ингаляции, после обработки; небулайзерной камеры до ингаляции, после ингаляции, после обработки; слива раковины до уборки, чистящая поверхность зубной щетки, фильтра компрессора. В нескольких семьях дополнительно были взяты смывы с внутренней поверхности пластиковой бутылочки и соски.

Исследование домашней среды детей с МВ показало разную степень обсемененности микроорганизмами изученных объектов (таблица 21). Наибольший процент высевов микроорганизмов выявлен в сливах раковин (88%), из внутренней поверхности маски после ингаляции (72%) и с чистящей поверхности зубных щеток (52%). Микробный пейзаж сливов раковин был представлен различными микроорганизмами: *Acinetobacter spp.*, (*A. junii*, *A. ursingii*), *Achromobacter spp.*, (*A. insolitus*, *A. insuavis*, *A. pichaundii*), *C. freundii*, *E. coli*, *K. oxitoca*, *P. mirabilis*, *S. maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *W. falsenii* (рисунок 28). Кроме того, с поверхности раковин выделяли бактерии рода *Staphylococcus spp.* (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*). 30 % смывов с раковин содержали бактерии *Pseudomonas spp.* Из 19% смывов высевали бактерии *P. aeruginosa*. 12% (3/25) раковин не были контаминированы бактериями, из них 2 раковины заливали на ночь «Доместосом», для дезинфекции третьей раковины использовали два средства («Доместос» и «Утенок»), но не придерживались определенного времени дезинфекции.

Таблица 21 – Процент высевов микроорганизмов с объектов домашней среды детей с МВ.

Объект	Процент конт.* объектов
Маска до ингаляции	12%
Маска после ингаляции	72%
Маска после обработки	12%
Небулайзерная камера до ингаляции	12%
Небулайзерная камера после ингаляции	16%
Небулайзерная камера после обработки	12%
Фильтр компрессора	28%
Раковина	88%
Зубная щетка	52%

*- процент объектов, контаминированных микроорганизмами, от их общего числа.

Обсемененность небулайзеров и объектов домашней среды детей МВ микроорганизмами представлена в таблице 22. Микроорганизмами *A. lwoffii*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* были контаминированы 4% масок до ингаляции. Микроорганизмы *Sphingomonas adhaesiva*, были высеяны из 4% смывов с небулайзерных камер до ингаляции, *S. epidermidis* из 8%. Микроорганизмы *A. lwoffii*, *S. aureus*, *Sphingomonas adhaesiva* были выделены с объектов небулайзеров, время стерилизации которых у одного из детей составляло 10 мин, у второго 20 мин, а у третьего не было указано. Это может свидетельствовать о том, что время стерилизации было недостаточным.

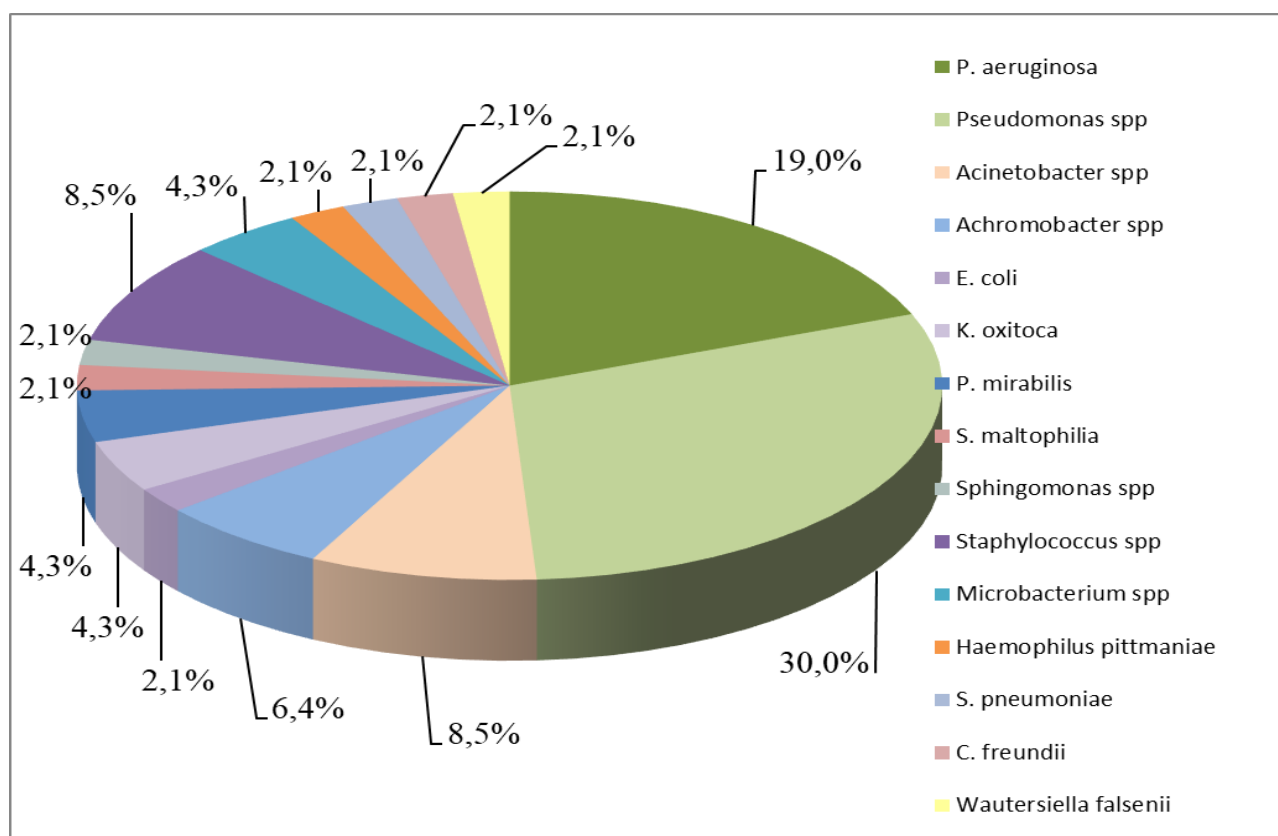


Рисунок 28. Частота встречаемости микрофлоры, выделенной из смывов раковин санузлов в квартирах детей МВ.

Микрофлора, выделенная из смывов, взятых с поверхности масок после ингаляции в 83% случаев была представлена нормальной микрофлорой ротовой полости, в 3% - *P. aeruginosa*, 11% - *S. aureus*, 3% - *Candida parapsilosis* (рисунок 28).

Таблица 22 – Обсемененность микроорганизмами небулайзеров и объектов домашней среды детей с МВ.

Объект	Маска до ингаляции	Маска после ингаляции	Маска после обработки	Фильтр компрессора до ингаляции
Микроорганизмы	<i>S. saprophyticus</i> (4%)	<i>S. epidermidis</i> (24%) <i>R. mucilaginosa</i> (20%) <i>S. mitis</i> (12%) <i>S. viridans</i> (8%) <i>S. salivarius</i> (4%) <i>S. pneumoniae</i> (4%) <i>N. flavescens</i> (4%) <i>Actinomyces oris</i> (4%) <i>Enterococcus spp</i> (4%)	<i>S. aureus</i> (4%)	<i>S. saprophyticus</i> 8% <i>S. epidermidis</i> 4% <i>S. hominis</i> 4% <i>N. subflava</i> 4%
	<i>A. lwoffii</i> (4%)	<i>S. aureus</i> (16%)	<i>Candida albicans</i> (4%)	<i>Aspergillus spp</i> 8%
	<i>S. aureus</i> (4%)	<i>P. aeruginosa</i> (4%)	<i>S. epidermidis</i> (8%)	<i>S. aureus</i> 4%
		<i>C. parapsilosis</i> (4%)		<i>A. lwoffii</i> 4%
Объект	Небулайзерная камера до ингаляции	Небулайзерная камера после ингаляции	Небулайзерная камера после обработки	Зубная щетка до использования
Микроорганизмы	<i>S. epidermidis</i> (8%):	<i>S. epidermidis</i> (16%):	<i>S. epidermidis</i> (4%)	<i>S. saprophyticus</i> (16%) <i>S. epidermidis</i> (8%) <i>S. warneri</i> (4%) <i>Bacillus spp</i> (4%) <i>E. faecium</i> (4%) <i>S. mitis</i> (12%) <i>R. mucilaginosa</i> (16%) <i>R. nasimurium</i> (4%)
			<i>S. warneri</i> (4%)	
			<i>Rothia dentocariosa</i> (4%)	
		<i>S. mitis</i> (4%)		<i>S. aureus</i> 16%
	<i>Sphingomonas adhaesiva</i> (4%)	<i>Achromobacter pichaundii</i> (4%)	<i>S. aureus</i> (4%)	<i>A. lwoffii</i> (4%)
				<i>P. aeruginosa</i> 4%

Для проверки эффективности дезинфекции небулайзеров проводили высевы из смывов после их обработки. С поверхности 24% (6/25) объектов небулайзера (масок и камер) высевали условно-патогенные микроорганизмы. Анализ анкетных данных показал, что исследованные небулайзеры были дезинфицированы следующими средствами: «Оптимакс проф», «Фаберли Соуфер», «Бриллиант Классик», «Synergetic д/посуды», «Белизна гель». С поверхности 12% (3/25) объектов небулайзера после дезинфекции выделяли *S. aureus*, *Candida albicans*. Эти небулайзеры были обработаны «Оптимакс проф», «Synergetic», «Белизна гель». Таким образом, при использовании вышеуказанных средств дезинфекция

не была достигнута. Возможно, что условия проведения обработки были не соблюдены.

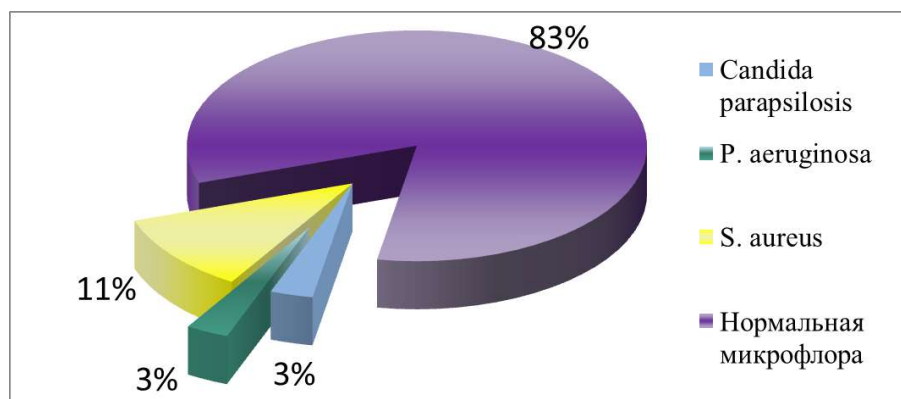


Рисунок 29. Микрофлора, выделенная с масок небулайзеров после ингаляции.

С чистящей поверхности 52 % зубных щеток высевали грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы. Из них 5% смывов содержали *P. aeruginosa*, 18% - *S. aureus*, 5% - *A. lwoffii*. 72% выделенных микроорганизмов при исследовании зубных щеток были представителями нормальной микрофлоры ротовой полости человека (Рисунок 30).

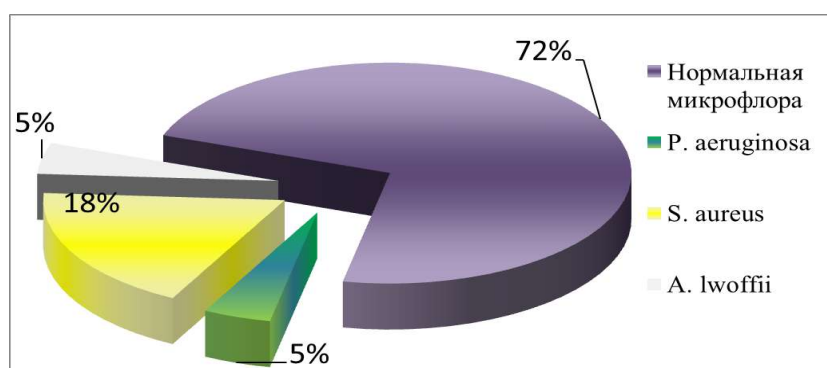


Рисунок 30. Микрофлора, выделенная с чистящей поверхности зубных щеток.

25% смывов с фильтров компрессора небулайзера содержали микроорганизмы. Из смывов с наличием роста микроорганизмов были выделены *Aspergillus niger* - 20%, *S. aureus* - 10%, *A. lwoffii* - 10% (таблица 2). Остальные микроорганизмы принадлежали к нормальной микрофлоре ротовой полости человека.

Исследованные в нескольких семьях дополнительные объекты внешней среды оказались также контаминированными микроорганизмами: у пациента №19 в смыве с внутренней поверхности детской пластиковой бутылочки был обнаружен *S. epidermidis*, с поверхности соски - *S. aureus*, *S. mitis*, бактерии рода *Enterococcus*, у пациента №20 с поверхности соски - *S. saprophyticus*, бактерии рода *Enterococcus*.

На момент мониторинга домашней среды 25 семей детей с МВ проводили микробиологическое исследование мокроты и мазков из зева, и только у 4 детей («№6, №13, №15, №23) высевали *P. aeruginosa*. Кроме того, из сливов раковин указанных детей были выделены бактерии *P. aeruginosa* (таблица 23). Из 21 ребенка, у которых из мокроты *P. aeruginosa* не высевалась на момент мониторинга, в 6 (29%) случаях выявлена контаминация объектов домашней среды бактериями *P. aeruginosa*. У больного №10 выделяли *P. aeruginosa* с чистящей поверхности зубной щетки и из слива раковины. У больного №11 высевали *P. aeruginosa* с небулайзерной маски после ингаляции. У 4 больных (№14, №17, №19, №22) *P. aeruginosa* выделяли из сливов раковины (таблица 23). Таблица 23 – Объекты домашней среды, контаминированные бактериями *P. aeruginosa*, у детей с МВ.

№ Пациента	Маска после обработки	Зубная щетка	Раковина
Дети с положительным высеваем из мокроты <i>P. aeruginosa</i>			
№6	-	-	+
№13	-	-	+
№15	-	-	+
№23	-	-	+
Отрицательный высев из мокроты <i>P. aeruginosa</i>			
№10	-	+	+
№11	+	-	-
№14	-	-	+

№17	-	-	+
№19	-	-	+
№22	-	-	+

Исследование генетического родства двух изолятов *P. aeruginosa* 3462p1 и 3462з1, выделенных с чистящей поверхности зубной щетки и раковины больного №10 в RAPD-PCR, показало, что они являются родственными штаммами, и относятся по RAPD к 138 кластеру (Рисунок 31). Изоляты 3394р и 3394-2, выделенные из слива раковины и мокроты больного №6 (Рисунок 32) также оказались родственными и принадлежали к 45 кластеру, ST 2390. А генотипы изолятов *P. aeruginosa*, выделенные из слива раковины и мокроты больных №15 и №23 отличались. В домашней среде пациента № 15 были выделены изоляты *P. aeruginosa* генотипы, которые отнесли к 141 и 142 кластеру по RAPD, а у больного №23 – генотипы 146 и 147 кластеров.

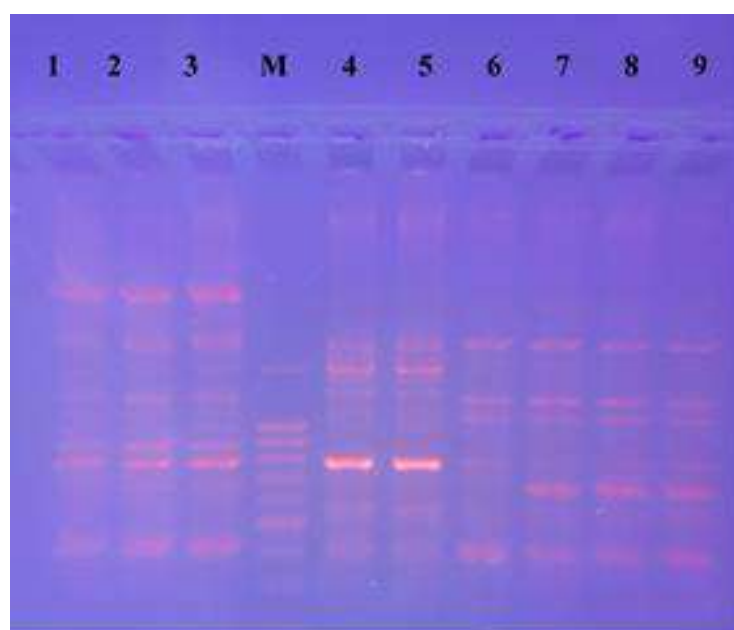


Рисунок 31. Электрофореграмма изолятов *P. aeruginosa*

1 – 268-2, 2 – 268-1, 3 – 167, 4 – 3462p1, 5 – 3462з1, 6 – № 3324, 7– № 3324-2, 8 – № 279В, 9 – № 159В

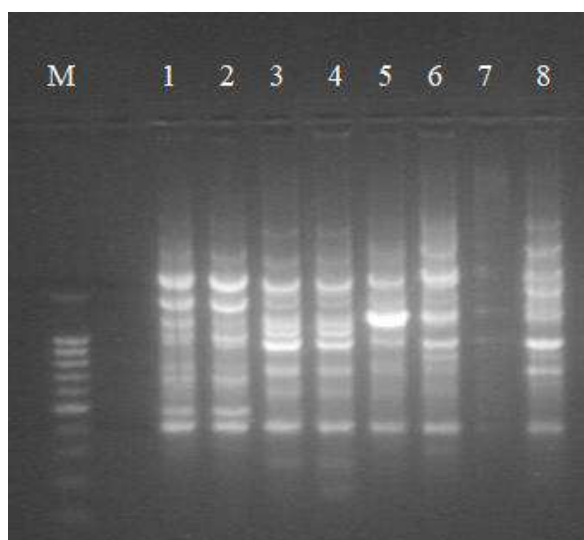


Рисунок 32. Электрофореграмма изолятов *P. aeruginosa*.

1 – 3396, 2 – 3045-1, 3 – 3402, 4 – 3017, 5 – 3394p, 6 – № 3394-2, 7 – № 3394m, 8 – № 196

Домашнюю среду двух пациентов (№ 4 и №13) исследовали в динамике. У пациента № 4 14.04.21 с маски небулайзера после обработки высевали грибы рода *Candida*, с поверхности небулайзерной камеры (до процедуры) *Sphingomonas adhaesiva*, а из слива раковины *A. lwoffii*. При следующем исследовании, через 12 мес. маска и небулайзерная камера не были контаминированы микроорганизмами, а из слива раковины высеяли бактерии *P. aeruginosa*. На момент исследования окружающей домашней среды, высев *P. aeruginosa* из мокроты ребенка был отрицательный. Ранее у данного больного регистрировали положительные высевы *P. aeruginosa*.

У пациента №13 15.12.2021 объекты небулайзера не были контаминированы микроорганизмами, а из слива раковины высевали бактерии *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Sphingomonas spp.* Через 6 мес. при исследовании домашней среды данного ребенка из слива раковины вновь высевали *P. aeruginosa*. А высев *P. aeruginosa* из мокроты ребенка был отрицательный.

Таким образом, исследования домашней среды в динамике двух детей показал, что применяемые в семье способы дезинфекции раковины были не эффективны в отношении бактерий *P. aeruginosa*. Недостаточная дезинфекция

объектов домашней среды может быть фактором риска реинфекции бактериями *P. aeruginosa*.

Исследование микрофлоры окружающей среды больных детей МВ выявило домашние очаги бактерий *P. aeruginosa*. Возможными источниками являлись сливы раковин санузла и чистящие поверхности зубных щеток. Наши исследования показали, что *P. aeruginosa* может оставаться на маске после ингаляции, таким образом, данный объект при ненадлежащем уходе также может являться фактором передачи *P. aeruginosa*.

Исследование изолятов методом RAPD-PCR выявило циркуляцию в домашней среде одного генотипа бактерий *P. aeruginosa* у больного ребенка МВ, что может привести к повторному инфицированию. В результате эрадикация *P. aeruginosa* подвергается риску.

Исследования эффективности профилактических мер по дезинфекции небулайзеров и раковин показали, что они являются недостаточными. После проведения дезинфекции с поверхности 25% (5/20) объектов небулайзера высевались микроорганизмы. 47% семей не выдерживали определенное время дезинфекции раковин. Положительную эффективность дезинфекции сливов раковин показала их обработка в течение ночи (т.е. более 3-8 часов). Кроме того, с фильтров компрессора небулайзеров и зубных щеток выделяли *A. lwoffii*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* и *S. aureus*, которые могут инфицировать легкие больного МВ, в том числе в ассоциации с *P. aeruginosa*. Поэтому данные объекты требуют частой замены при использовании пациентами с МВ.

Анализ эффективности дезинфекции объектов внешней среды больных МВ показал необходимость разработки рекомендаций по профилактике и распространения инфекции, вызванной бактериями *P. aeruginosa* в домашних условиях.

Глава 6. Чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* к дезинфицирующим средствам

Бактерии *P. aeruginosa* способны выживать в окружающей среде, в том числе в различных растворах [119,120], применяемых в медицине, и способны длительно сохранять жизнеспособность на предметах медицинского назначения (на металлических инструментах - до 12 суток). Известно, что *P. aeruginosa* способна сохраняться в дистиллированной воде до 130 суток [120]. В отделениях Центров Муковисцидоза проходят лечение пациенты с хронической инфекцией легких, которые могут быть источниками штаммов микроорганизмов резистентных к антибактериальным препаратам и дезинфицирующим средствам (ДС), в результате массивной антибиотикотерапии и постоянного действия дезинфектантов. В таких отделениях особенно актуальным является применение дезинфицирующих средств, к которым чувствительны мультирезистентные штаммы *P. aeruginosa*.

С 2010 года исследование и контроль устойчивости микроорганизмов к ДС закреплён в нормативных документах. Согласно СанПиНу 2.1.3.2630-10 в п.6.2 указано: «В целях предупреждения возможного формирования резистентных к дезинфектантам штаммов микроорганизмов следует проводить мониторинг устойчивости госпитальных штаммов к применяемым дезинфицирующим средствам с последующей их ротацией при необходимости» [177].

Изучение чувствительности бактерий *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ с хронической инфекцией легких, к ДС разных групп, проводили в сравнении с чувствительностью изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от контрольной группы больных, не страдающих МВ.

Были изучены 67 культур *P. aeruginosa*, выделенные от больных в период 2005-2020 гг. Исследуемые изоляты *P. aeruginosa* были разделены на 3 группы: 1) изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из мокроты детей больных МВ (ДМВ) - 20

изолятов, 2) изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из мокроты взрослых больных МВ (ВМВ) - 23 изолята, 3) изоляты *P. aeruginosa*, выделенные из зева, уха, мочи, ран (абдоминальное отделяемое) взрослых больных при острой синегнойной инфекцией не страдающих МВ (НеМВ) - 24 изолята.

6.1 Исследование чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам, предназначенным для обеззараживания медицинских изделий

При первичном осмотре больных МВ и при лечении в стационаре врачи используют одноразовые нитриловые медицинские перчатки. Наиболее доступным дезинфицирующим средством для обработки рук во всех центрах МВ России является этиловый 70%-й спирт (ЭС) и дезинфектанты на его основе. Медицинские пластмассовые полимерные изделия (пластик) широко используются в медицине. Пластиковые детали медицинских приборов и инструментов, трубки бронхоскопов, шприцы, предметы ухода за больными, зонды окружают пациентов МВ и в стационаре и дома. Поэтому исследование медицинских изделий из пластика представляло особый интерес и нашей целью являлось оценить дезинфицирующую способность ЭС в отношении *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ.

При исследовании чувствительности *P. aeruginosa* к 70% этиловому спирту (ЭС) при обработки медицинских синтетических (нитриловых) перчаток и медицинского пластика в течение 15 сек. были выявлены устойчивые изоляты *P. aeruginosa*, выделенные среди всех трех групп больных (Таблица 24). При экспозиции в течение 15 сек. характеризовались чувствительностью к ЭС 36.8% изолятов *P. aeruginosa* группы ДМВ, 56.5 % изолятов, выделенных от больных группы ВМВ и 54.2% изолятов группы НеМВ. При изменении режима дезинфекции, экспозиции до 30 с количество чувствительных к ЭС изолятов *P.*

aeruginosa групп ВМВ и НеМВ составило 100%, а в группе изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных детей МВ – 89.9%, 2 изолята были резистентны к ЭС (Рисунок 33).

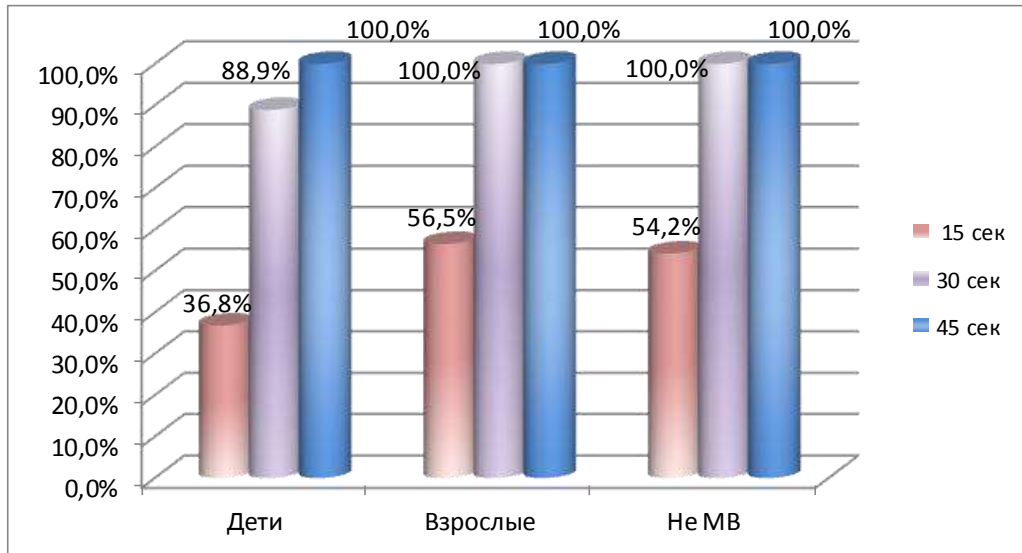


Рисунок 33. Чувствительность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов, к 70% этиловому спирту при обработке медицинских перчаток.

Исследование эффективности 70% этилового спирта при обработке медицинского пластика в течение 15 с показало чувствительность 42.1% изолятов *P. aeruginosa* группы ДМВ к ЭС, 65.2 % изолятов, выделенных от больных группы ВМВ и 66.7 % изолятов группы НеМВ (Рисунок 34). При изменении режима дезинфекции до 30с количество чувствительных к ЭС изолятов *P. aeruginosa* групп ВМВ и ДМВ составило 95.7% и 88.9%, соответственно, а в группе изолятов *P. aeruginosa*, НеМВ - 100% .

Обработка 70% этиловым спиртом медицинских перчаток и пластика в течение 45 секунд показало чувствительность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от всех трех групп пациентов в 100% случаев.

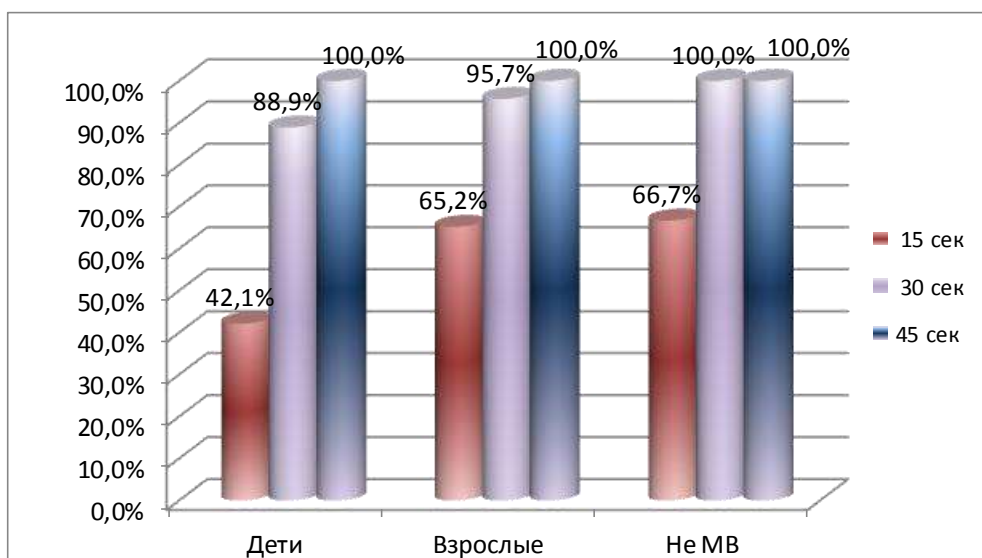


Рисунок 34. Чувствительность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов, к 70% этиловому спирту при обработке медицинского пластика.

Таблица 24 – Устойчивость изолятов *P. aeruginosa* к 70% этиловому спирту при обработки медицинских перчаток и пластика.

№ штамма	Перчатки			Пластик		
	15 сек	30 сек	45 сек	15 сек	30 сек	45 сек
69B	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
279B	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
273-1B	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч
273-2B	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
119-2B	У	Ч	Ч	У	У	Ч
014	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
07	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
09	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
22-2B	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
71-1mB	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
77B	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
67-3B	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
63B	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
91B	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч
33	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
896	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч
469	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч
196	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

010	қ	қ	қ	қ	қ	қ
020	у	қ	қ	қ	қ	қ
48B	қ	қ	қ	қ	қ	қ
01	у	қ	қ	у	қ	қ
7B	у	қ	қ	қ	қ	қ
360-2	қ	қ	қ	у	у	қ
8Л	қ	қ	қ	қ	қ	қ
33-1B	қ	қ	қ	қ	қ	қ
76-1mЛ	қ	қ	қ	у	қ	қ
147B	қ	қ	қ	қ	қ	қ
431-1	у	у	қ	қ	қ	қ
431-2	у	қ	қ	у	қ	қ
897	қ	қ	қ	қ	қ	қ
159B	у	қ	қ	у	қ	қ
824	у	қ	қ	қ	қ	қ
03	қ	қ	қ	у	қ	қ
122-2	у	қ	қ	у	қ	қ
333	у	қ	қ	қ	қ	қ
3045-1	у	қ	қ	у	у	қ
3045-2	қ	қ	қ	у	қ	қ
73-2B	у	қ	қ	у	қ	қ
04	қ	қ	қ	қ	қ	қ
05	у	қ	қ	қ	қ	қ
140	у	қ	қ	у	қ	қ
011	қ	қ	қ	қ	қ	қ
012	у	қ	қ	қ	қ	қ
06	қ	қ	қ	у	қ	қ
431-3	у	у	қ	қ	қ	қ
38-1	қ	қ	қ	у	қ	қ
37B	қ	қ	қ	қ	қ	қ
107-3B	қ	қ	қ	у	қ	қ
107-2B	у	қ	қ	у	қ	қ
107-1B	у	қ	қ	у	қ	қ
02	у	қ	қ	қ	қ	қ
275-1B	қ	қ	қ	қ	қ	қ
275-3B	қ	қ	қ	қ	қ	қ
050	қ	қ	қ	у	қ	қ
051	қ	қ	қ	у	қ	қ
052	у	қ	қ	у	қ	қ
053	у	қ	қ	у	қ	қ
054	у	қ	қ	қ	қ	қ

055	ч	ч	ч	у	ч	ч
056	ч	ч	ч	ч	ч	ч
057	у	ч	ч	ч	ч	ч
058	у	ч	ч	ч	ч	ч
059	ч	ч	ч	ч	ч	ч
071	ч	ч	ч	ч	ч	ч
167	у	ч	ч	у	ч	ч

У – устойчивый штамм к 70%-спирту в указанном режиме (после обработки ЭС наблюдался рост *P. aeruginosa*

Ч – чувствительный штамм к 70%-спирту в указанном режиме (после обработки ЭС отсутствовал рост *P. aeruginosa*).

Для изолятов *P. aeruginosa* 431-1 и 431-3, выделенных от одного пациента, потребовалось для достижения эффекта обеззараживания 70% этиловым спиртом больше времени, чем для других изолятов, 45 сек. Данные изоляты были фенотипически разные и относились к одному сиквенсу типу ST 381. Изолят 431-1 характеризовался резистентностью к офлоксацину, а изолят 431-3 к имипенему и гентамицину.

6.2 Исследование чувствительности *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам в растворе.

Чувствительность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов МВ к дезинфицирующим средствам («Торихлор», «Изумруд», «Миродез») в растворе проводили в соответствии с режимами, указанными в инструкции по применению конкретного ДС с различными концентрациями. 94.7% изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от группы пациентов ДМВ, были чувствительны к «Торихлору» (ТХ) с концентрациями С=0,00375% и С=0,0075%, 100 % - к ТХ с концентрацией С=0.015%. 60.9% изолятов *P. aeruginosa* ВМВ, были чувствительны к ТХ с С=0,00375%, 65.2% – к ТХ с С=0.075%, и 100% – к торихлору с концентрацией

$C=0.015\%$. 91.7 % изолятов *P. aeruginosa* НеМВ, были чувствительны к ТХ с концентрацией $C=0.00375\%$ и 95.8% изолятов к ТХ с концентрацией $C=0.0075\%$, 100% - к ТХ с концентрацией $C=0.015\%$ (Рисунок 35). Таким образом, к ТХ с $C=0.00375\%$ были чувствительны 94.4% изолятов, выделенных от больных группы ДМВ и 91.7% изолятов от больных группы НеМВ. Для дезинфицирующего эффекта 34.8% изолятов *P. aeruginosa* выделенных от больных группы ВМВ необходима концентрация ТХ, не менее $C=0.015\%$.

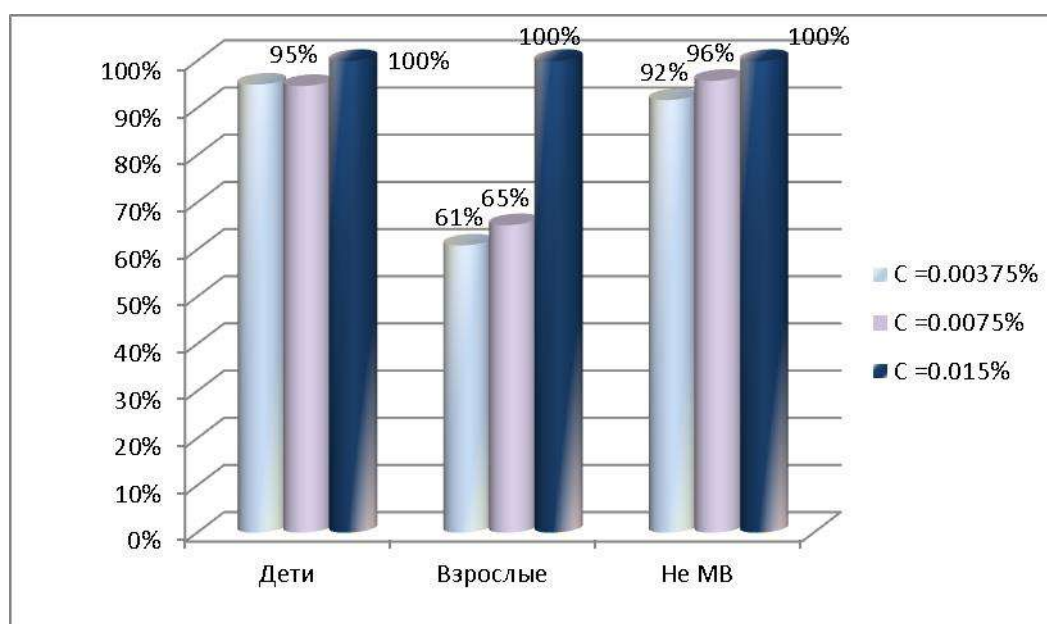


Рисунок 35. Чувствительность *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов, к ДС «Торихлор» с концентрацией в процентах ($C=0.00375-0.15\%$) в течение 1 часа ($p<0.05$).

Режим обработки 0.015% раствором «Торихлор» 1 час (заявленный производителем) был эффективен в отношении 100% изолятов *P. aeruginosa* всех трех групп. Таким образом, необходимо строгое соблюдение инструкции производителя.

К ДС «Изумруд» с концентрацией 0.1% были чувствительны 40 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от группы пациентов ДМВ, 39% от ВМВ и 75% изолятов пациентов НеМВ (Рисунок 36). Режим обработки «Изумрудом» в концентрации 0.3% был эффективен в отношении 100% изолятов *P. aeruginosa*

группы НеМВ. Для 17 % изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ и для 16 % изолятов ДМВ этот режим оказался неэффективным, наблюдали высев *P. aeruginosa*. 90 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных ДМВ, и 96 % изолятов от пациентов ВМВ были чувствительны к «Изумруд» с концентрацией $C=0.4\%$, а с концентрацией $C=0.5\%$ чувствительны были 100 % изолятов *P. aeruginosa* этих двух групп. Что соответствует режиму заявленному производителем ($C=0.5\%$, 30 мин).

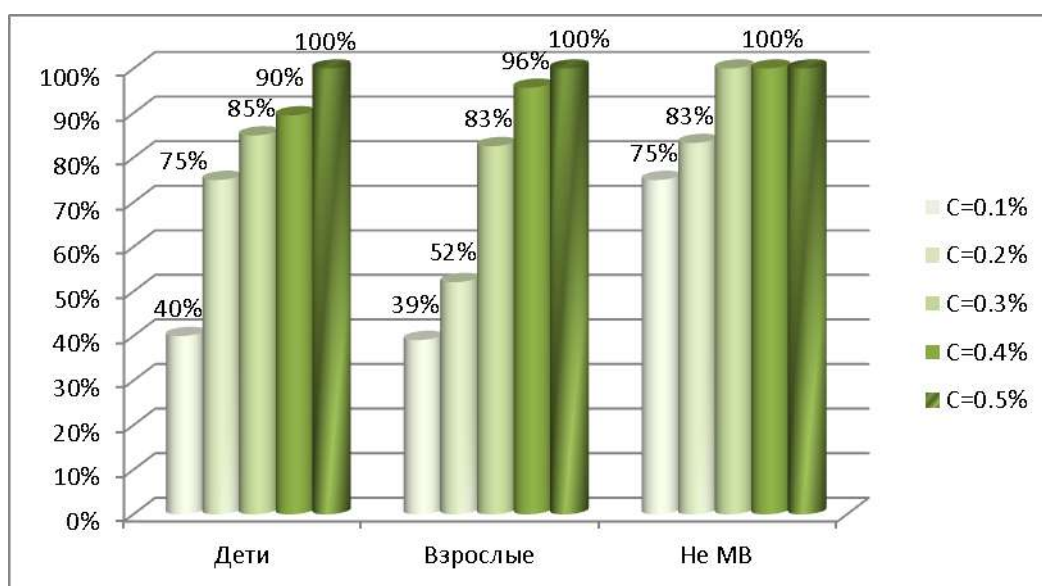


Рисунок 36. Чувствительность *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов, к ДС «Изумруд» с концентрацией в процентах ($C=0.1-0.5\%$) в течение 30 мин ($p>0.05$).

К ДС «Миродез Универ» с $C=0.08\%$ и $C=0.09\%$ были чувствительны 4 % изолятов *P. aeruginosa* группы НеМВ. К ДС «Миродез Универ» с $C=0.08\%$ были чувствительны 5 % и 9 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов групп ДМВ и ВМВ. К «Миродез Универ» с $C=0.09\%$ были чувствительны 11% и 17% изолятов групп ДМВ и ВМВ, соответственно (Рисунок 37). При режиме обработки этого ДС с концентрацией 0.1% в течение 30 мин (заявленным производителем) чувствительными были 47% изолятов *P. aeruginosa* группы ДМВ, 35% изолятов группы ВМВ и 29% изолятов группы НеМВ. Для обеззараживания изолятов *P. aeruginosa* каждой группы потребовались большие

концентрации ДС, чем указанные в инструкции производителя. К «Миродез Универ» с концентрацией 0.12% были чувствительны 84% изолятов *P. aeruginosa* группы ДМВ, 78% изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ и 88% изолятов *P. aeruginosa* группы НеМВ. К «Миродез Универ» с концентрацией 0.15% и 0.20% были полностью чувствительны 100 % изолятов *P. aeruginosa* групп ДМВ и НеМВ, и 91 % изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ. 2 изолята *P. aeruginosa* (48В и 107-3В), выделенных от двух взрослых больных МВ, были резистентны к ДС с концентрациями 0.15% и 0.20%. Изолят 48В был чувствителен только к «Миродез Универ» с концентрацией 0.22%, а изолят 107-3В к этому ДС с концентрацией 0.25%. Таким образом, было показано, что бактерицидное действие «Миродез Универ» к 100% изолятам *P. aeruginosa* группы ВМВ было достигнуто при режиме С=0.25%, 30 мин.

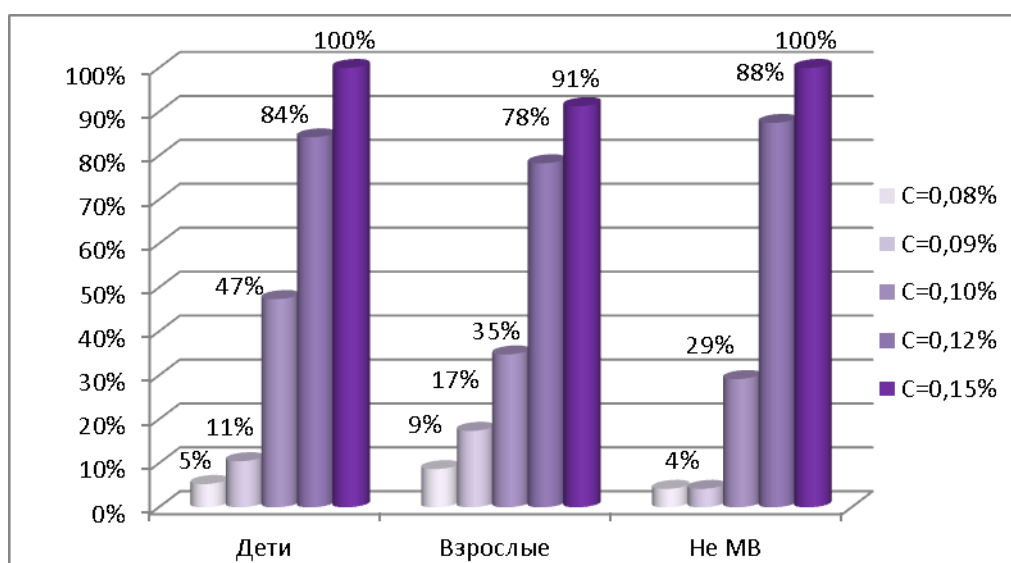


Рисунок 37. Чувствительность *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов к ДС «Миродез» с концентрацией С=0.08-0.15% в течение 30 мин ($p>0.05$).

6.3 Исследование чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам, предназначенным для обеззараживания поверхностей (керамической плитки).

Для изучения чувствительности микроорганизмов *P. aeruginosa* к ДС, применяемым для дезинфекции поверхностей внутри помещений, в качестве тест-объектов была выбрана керамическая плитка, которую используют в качестве декоративно-отделочных и конструктивных материалов для ЛПУ. Режим обработки плитки ДС «Торихлор» с концентрацией 0.00375% был эффективен в отношении 88% изолятов *P. aeruginosa* группы HeMB, 75% - группы ДМВ, 48% изолятов – группы ВМВ. К «Торихлор» в концентрации 0.0075% были чувствительны 96% штаммов *P. aeruginosa* группы HeMB, 75% - группы ДМВ, 48% штаммов группы ВМВ. Обеззараживание плитки ТХ в концентрации 0.015% в течение 1 часа было эффективно в отношении 100% изолятов трех исследуемых групп (Рисунок 38).

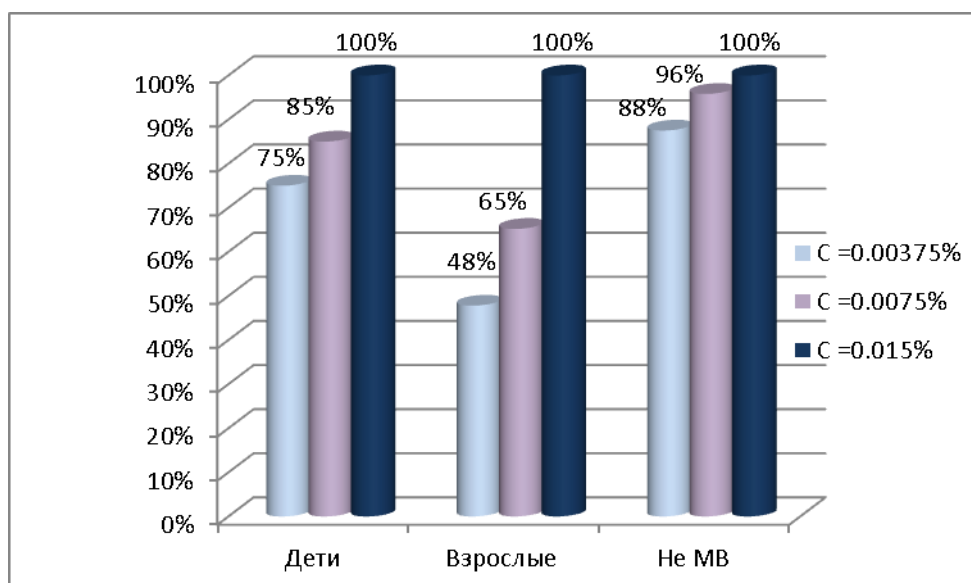


Рисунок 38. Чувствительность изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов к ДС «Торихлор» с концентрацией $C=0.00375-0.15\%$, при обеззараживании поверхностей в течение 1 часа ($p<0.05$).

При обработке плитки ДС Изумруд концентрацией 0.1% были чувствительны 50 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от группы пациентов ДМВ, 57% от ВМВ и 67% изолятов НеМВ (Рисунок 39). Режим обработки «Изумруд» в концентрации 0.3% был эффективен в отношении 100% изолятов *P. aeruginosa* группы НеМВ, 87 % изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ и 90 % изолятов ДМВ. 100 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп больных МВ, были чувствительны к этому ДС с концентрацией 0.4%. То есть для обеззараживания плитки с инокулированными бактериями *P. aeruginosa* потребовались меньшие концентрации ДС по сравнению с дезинфекцией раствора, когда для полного обеззараживания необходимо было использовать концентрацию ДС 0.5%.

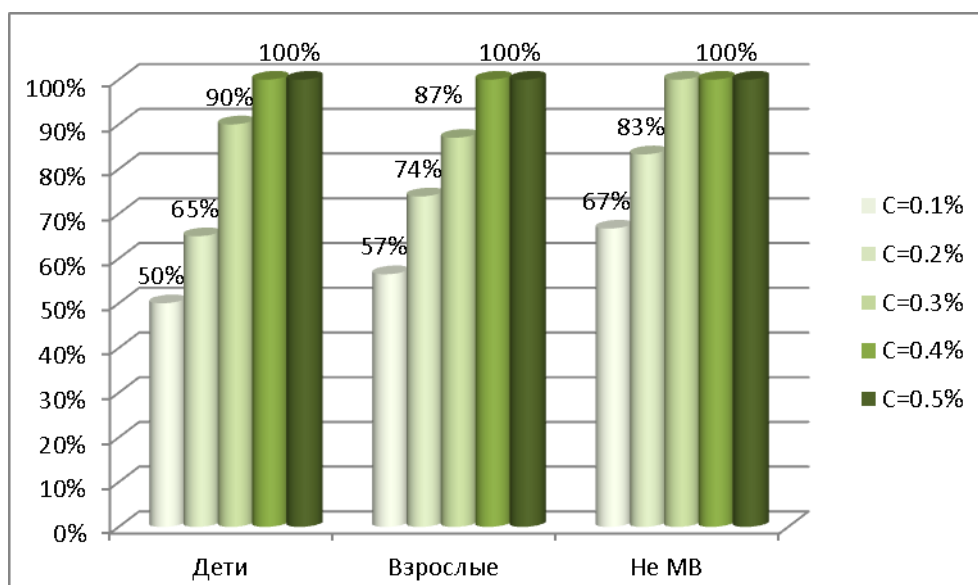


Рисунок 39. Чувствительность *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов к ДС «Изумруд» с концентрацией в процентах (C=0.1-0.5%), при обеззараживании поверхностей плитки в течение 30 мин ($p>0.05$).

К ДС «Миродез Универ» с C=0.08%, нанесенному на поверхность керамической плитки были чувствительны 5% изолятов *P. aeruginosa* группы ДМВ, 4% изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ и 8% изолятов *P. aeruginosa* группы НеМВ (Рисунок 40). При режиме обработки плитки ДС с концентрацией

0.1% в течение 30 мин (режим заявленный производителем) не было достигнуто полное бактерицидное действие ДС: чувствительны были 70% изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов группы ДМВ, 48% - группы ВМВ и 75% - группы НеМВ. К ДС «Миродез Универ» с концентрацией 0.12% были чувствительны 90% изолятов *P. aeruginosa* группы ДМВ, 87% изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ и 100% изолятов *P. aeruginosa* группы НеМВ. К ДС с концентрацией 0.15% и 0.20% были полностью чувствительны 95 % изолятов *P. aeruginosa* групп ДМВ и 96 % изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ. Два изолята *P. aeruginosa* (48В и 196) обладали неполной чувствительностью к концентрациям 0.15% и 0.20% ДС. Штамм 48В, выделенный от взрослого пациента МВ, был полностью чувствителен только к «Миродез Универ» с концентрацией 0.22%, а штамм 196, выделенный от ребенка с МВ - к «Миродез Универ» с концентрацией 0.25%.

Таким образом, в ходе нашего исследования полное бактерицидное действие «Миродез Универ» к изолятам *P. aeruginosa* было достигнуто при режиме дезинфекции $C=0.25\%$, 30 мин.

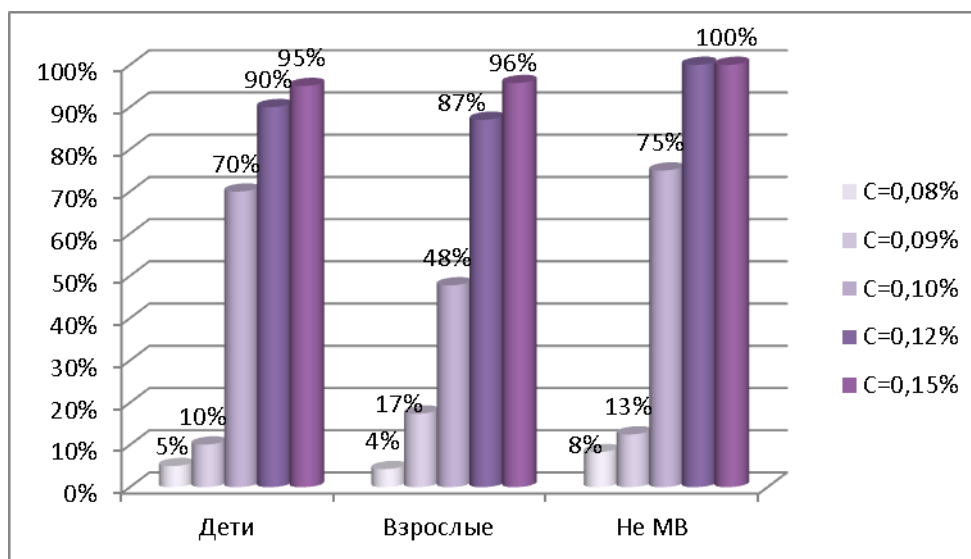


Рисунок 40. Чувствительность *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов, к ДС «Миродез Универ» с концентрацией в процентах ($C=0.1-0.5\%$), при обеззараживании поверхностей плитки в течение 30 мин ($p>0.05$).

Оценка антимикробной активности изученных ДС в растворе и на поверхности керамической плитки показала, что заявленный производителем режим обеззараживания (0.1% в течение 30 мин) для дезинфектанта на основе ЧАС и альдегида («Миродез Универ») оказался неэффективным для изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от всех трех исследованных групп. 100% изолятов *P. aeruginosa* были чувствительны при режиме: концентрации «Миродез Универ» 0,25% в течение 30 мин.

Заявленные производителями режимы обеззараживания для дезинфектантов на основе ЧАС, гуанидина и ПАВ («Изумруд») и хлорсодержащего ДС («Торихлор») были эффективны в отношении 100% изолятов *P. aeruginosa* всех трех групп пациентов в обоих вариантах использования, и в растворе, и при обеззараживании поверхности керамической плитки.

Анализ устойчивости к трем изученным ДС изолятов *P. aeruginosa* трех групп больных выявил, что для обеззараживания изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих МВ, требовались меньшие концентрации. Для обеззараживания изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых больных, требуются большие концентрации ДС, чем для *P. aeruginosa* групп ДМВ и НеМВ. Так, к «Торихлору» с концентрацией 0.0075% были чувствительны 94.4% изолятов, выделенных от больных группы ДМВ и 91.7% изолятов от больных группы НеМВ, и только 65% изолятов *P. aeruginosa* ВМВ. Что может быть связано с длительной персистенцией этих штаммов у взрослых пациентов, и увеличением адаптационного потенциала бактерии, в том числе, обеспечивающего резистентность к ДС. Резистентными к «Торихлору» с концентрацией 0,0075% были изоляты: 014 *P. aeruginosa* группы НеМВ, 431-1 *P. aeruginosa* группы ДМВ, отнесенные к сиквенс-типу ST 381 и 8 других изолятов *P. aeruginosa* группы ВМВ. Среди них были изоляты 22-2В и 67-3В, выделенные от одного больного в динамике. Оба изолята принадлежали к эпидемическому клону ST 274. Было показано, что изолят 67-3В обладал высокой способностью к образованию биопленок.

К ДС «Миродез» в растворе наиболее устойчивыми были 2 изолята группы ВМВ 107-3В и 48В, бактерицидное действие ДС, к которым, было достигнуто при концентрациях 0.22% и 0.25%, соответственно. Для обеззараживания изолятов *P. aeruginosa*: 196 группы ДМВ и 48В группы ВМВ при исследовании на поверхности плитки необходимы были более высокие концентрации «Миродез» 0.22% и 0.25%, соответственно. Изолят 48В обладал множественной резистентностью к антибиотикам и относился к ST 235. Изолят 196 имел мукоидной фенотип и относился к ST 2390.

Изоляты *P. aeruginosa*: 167 и 431-2 группы ДМВ и изолят 273-1В группы ВМВ были чувствительны к ДС «Изумруд» в концентрации С=0,5%. По нашим данным изолят 167 был сильным мутатором, обладал множественной резистентностью к антибиотикам и относился к ST 235. А также у изолята 167 нами были выявлены металло-β-лактамазы VIM-типа. Изолят 431-2 был резистентен к азлоциллину, офлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину и относился к ST 381. Кроме того, у изолята 431-2 были выявлены бета-лактамазы С класса: blaPDC-14, *_beta-lactamase* blaOXA-50. Изолят 273-1В также имел более высокую устойчивость к ДС «Торихлор» (с концентрацией 0,0075%) и поэтому характеризовался как штамм, более устойчивый (по сравнению с другими изолятами группы взрослых больных) к нескольким видам ДС, т.е. имеющий ассоциированную устойчивость к ДС.

Генотипически идентичные изоляты, выделенные от одного больного, имели разную чувствительность к ДС. То есть фенотипическая гетерогенность этих изолятов наблюдалась не только по отношению к антибиотикам, а также к дезинфицирующим средствам. Так изоляты 431-1, 431-2, 431-3 *P. aeruginosa* ST381, выделенные из мокроты 4-летнего ребенка, имеющие различные фенотипы и отличающиеся по антибиотикорезистентности, имели разную чувствительность к ДС. Изоляты *P. aeruginosa* 431-1 и 431-2 были чувствительны к «Торихлору» в концентрации С=0,00375%, а изолят 431-3 был чувствителен к этому ДС в концентрации С=0,015%. К «Изумруд» в концентрации 0.2% были

чувствительны изоляты 431-1 и 431-3. Для обеззараживания изолята 431-2 потребовалась концентрация $C=0.5\%$ этого ДС. Изолят 431-3К был чувствителен к ДС «Миродез» с концентрацией 0.09%, изолят 431-2 - к ДС с концентрацией 0,15%, а изолят 431-1 - к ДС в концентрации 0,015%. То есть из трех изолятов 431-1 был наиболее устойчив к ДС «Миродез», 431-2 к ДС «Изумруд», а 431-3 к ДС «Торихлор». Таким образом, можно предположить, что при использовании одного из ДС повышается возможность выживания (адаптации) для двух из трех выделенных изолятов особенно при несоблюдении режимов дезинфекции.

Наше исследование показало, что для эффективного предупреждения распространения резистентных изолятов и предотвращения вспышечной заболеваемости больных МВ эпидемически значимыми клонами *P. aeruginosa* необходимо исследовать и осуществлять контроль их устойчивости к дезинфицирующим средствам, а также мониторировать режимы дезинфекции.

Глава 7. Меры профилактики инфицирования бактериями *Pseudomonas aeruginosa* в стационаре и в домашних условиях проживания пациентов МВ

Для профилактики ХИЛ, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, врачам разных специальностей, работающим с пациентами с МВ, необходимо соблюдать триаду мониторинга: 1) проводить эпидемиологический мониторинг, 2) микробиологический мониторинг, включающий молекулярно-генетический исследования, 3) клинический мониторинг [178,179].

В ходе эпидемиологического мониторинга были проанализированы результаты обследования групп больных по возрасту, полу, этиологической структуре инфекции, вызванной *P. aeruginosa* (моноинфекция, ассоциация микроорганизмов с бактериями *P. aeruginosa*), по типу мутаций гена CFTR для определения групп риска. Показаны особенности распространения на территории РФ различных генотипов бактерий *P. aeruginosa* у пациентов МВ.

В ходе эпидемиологического мониторинга было установлено, что для профилактики хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*, необходимо как можно более раннее установление диагноза «Муковисцидоз» у детей (в настоящий время проводят скрининг новорожденных по «потовому» тесту) и безотлагательного исследования микробиологических показателей нижних дыхательных путей, учитывая то, что результаты динамического наблюдения за 101 пациентом, свидетельствовали о росте концентрации бактерий *P. aeruginosa* от 1КОЕ до 1×10^5 КОЕ в течение 6 месяцев и развитии хронической инфекции легких у детей достаточно рано - в возрасте до 2 лет.

7.1 Разработка алгоритма микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом, вызванной бактериями *P. aeruginosa*.

На основании данных, полученных в результате микробиологического мониторинга хронической инфекции легких, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, был разработан алгоритм микробиологического мониторинга для выявления, регистрации и контроля за инфекцией нижних дыхательных путей, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, у больных с муковисцидозом для усовершенствования ранее предложенного информационно-аналитического блока эпидемиологического надзора [180]. В алгоритм были включены ранее предложенные в клинических рекомендациях и дополненные нами пункты, касающиеся диагностической части [181]. Алгоритм содержит следующие действия (Рисунок 41):

- ✓ 1. Мониторинг микрофлоры дыхательных путей для раннего выявления инфекции легких больных, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, необходимо осуществлять с момента постановки диагноза муковисцидоз.
- ✓ 2. При мониторинге ХИЛ производят забор мокроты, так как из всех клинических образцов мокрота является рекомендуемым материалом для посева [181].
 - ✓ 2а) Забор мазка из зева проводят при невозможности получить образец мокроты [181].
 - ✓ 2б) Исследование мокроты следует проводить не позднее 2 ч после ее сбора. 2-3 часовое хранение (при $t=4-8^{\circ}\text{C}$) не влияет на жизнеспособность микрофлоры. При удлинении сроков (до 18-20 час) исследования образцы должны храниться в холодильнике при температуре 4°C [181].
 - ✓ 2в) Для диагностики хронической инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, клинические образцы необходимо брать при каждом посещении

поликлиники (не реже 1 раз в 3 мес), а также при каждом случае обострения, при каждой госпитализации.

- ✓ 3. Сразу после первого посева бактерий *P. aeruginosa* целью постоянного мониторинга, информацию о пациентах с МВ вносят в электронную базу данных ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*.
- ✓ 4. Наличие бактерий *P. aeruginosa* в образце мокроты в любой концентрации имеет клиническое значение. Необходимо проводить идентификацию *P. aeruginosa*, учитывая особенности фенотипа данного микроорганизма у больных МВ.
- ✓ 5. Учет результатов ввиду постоянной антибиотикотерапии у пациентов с МВ требует особой тщательности.
- ✓ 5а) Учет результатов бактериологического исследования мокроты, посеянной позднее 2-3 часов после отбора, должен интерпретироваться с осторожностью, необходимо учитывать и проанализировать данные предыдущих исследований и при необходимости повторить исследование [181].
- ✓ 5б) При постоянных отрицательных результатах мазка из зева, но при снижении функции легких необходимо исследовать индуцированную гипертоническим раствором мокроту или БАЛ [181].
- ✓ 6. Рекомендации по антибиотикотерапии синегнойной инфекции давать на основании анализа чувствительности к антимикробным препаратам изолятов *P. aeruginosa* всех фенотипов, выделенных из одного образца мокроты.
- ✓ 7. ПЦР-диагностика. Использование ПЦР-диагностики для контроля распространения штаммов *P. aeruginosa* эпидемических генотипов.
- ✓ 8. Необходимо вести контроль и наблюдение, анализ выявленных случаев синегнойной инфекции (через 2 недели, 3 мес, 6 мес), при обострениях в течение всей жизни пациента.

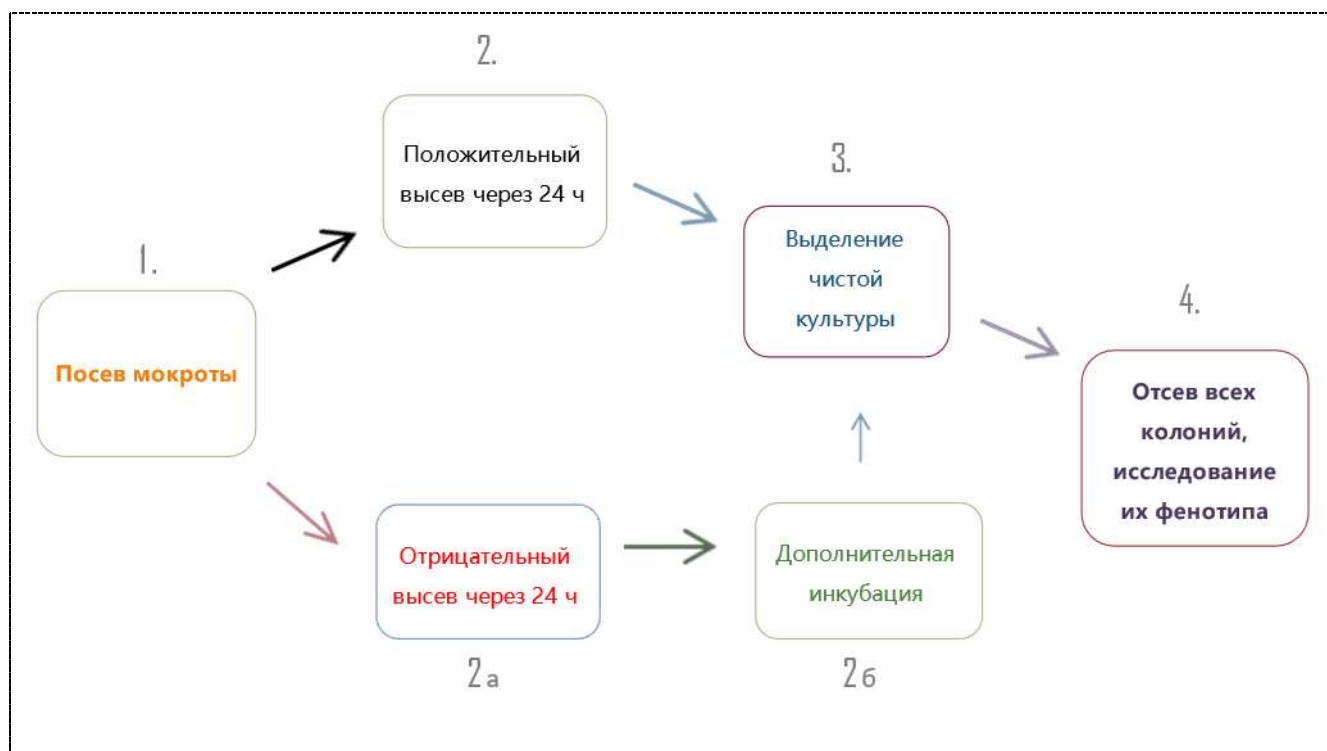


Рисунок 41. Схема алгоритма микробиологического мониторинга для выявления, регистрации и контроля инфекции нижних дыхательных путей, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, у больных муковисцидозом для профилактики синегнойной инфекции.

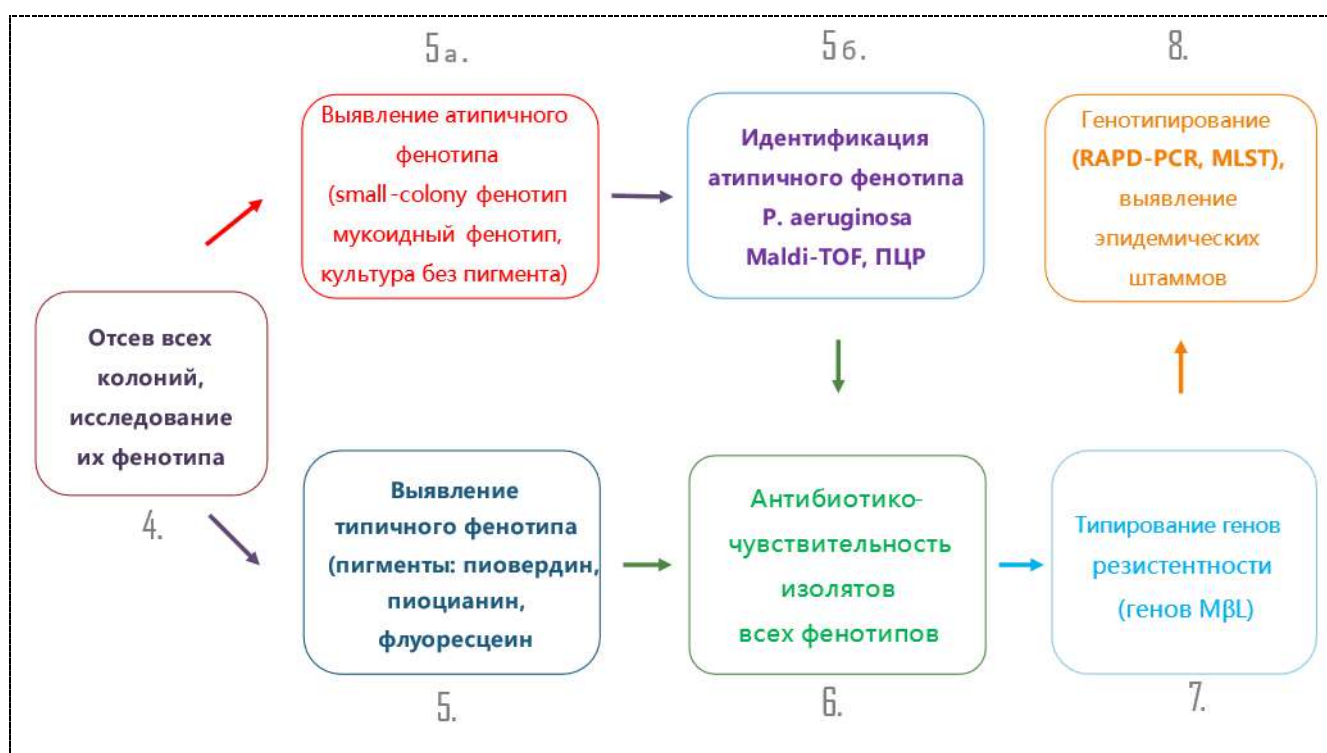
Разработка алгоритма микробиологического мониторинга показала необходимость усовершенствования алгоритма идентификации бактерий *P. aeruginosa* у пациентов с МВ (Рисунок 42). Мониторинг выявил необходимость проводить исследования, учитывая особенности фенотипа *P. aeruginosa*. Алгоритм идентификации бактерий *P. aeruginosa* у пациентов с МВ, включает следующие этапы:

- ✓ 1. Посев на агаризованные питательные среды (ЦПХ, кровяной агар).
- ✓ 2. Наблюдение за ростом колоний спустя 24 ч. При отрицательном высеве необходима дополнительная инкубация посевов 48 ч. (37°C), 72 ч. (22-25 °C) для выявления колоний *P. aeruginosa* SCV-фенотипа (Рисунок 42а).
- ✓ 3. Выделение чистой культуры *P. aeruginosa* (Рисунок 42а).
- ✓ 4. Отсев колоний всех фенотипов *P. aeruginosa* (Рисунок 42а).
- ✓ 5. Идентификацию изолятов, имеющих типичный фенотип *P. aeruginosa*, проводить на основании таких фенотипических свойств, как

пигментообразование, гемолиз, положительная оксидазная реакция, рост при 42°C (Рисунок 42б).



а)



б)

Рисунок 42. Алгоритм идентификации *P. aeruginosa* у пациентов с МВ для правильной диагностики синегнойной инфекции.

на рисунке а) представлены этапы алгоритма 1-4

на рисунке б) представлены этапы алгоритма 4-8

Для идентификации культур с атипичными фенотипами (SCV-фенотип, мукоидный, без пигмента) необходимо изучать их основные биохимические свойства, и ввиду ложноотрицательных результатов при идентификации коммерческими тест-системами обязательно применять методы ПЦР-диагностики или MALDI-TOF масс-спектрометрию (Рисунок 42б).

- ✓ 6. Исследование чувствительности к антибиотикам необходимо проводить для каждого изолята *P. aeruginosa* всех фенотипов, выделенных из одного образца мокроты (Рисунок 42б).
- ✓ 7. Выявление генов резистентности для правильного лечения пациентов с МВ, а также генов металло- β -лактамаз (M β L), которые могут являться маркером госпитальной инфекции (Рисунок 42б).
- ✓ 8. Используя методы ПЦР-диагностики необходимо определять сиквенс-тип изолятов бактерий *P. aeruginosa*, характеризующихся множественной резистентностью, и проверять относятся ли они к эпидемически значимым генотипам.

Результаты молекулярно-генетического мониторинга показали необходимость типирования множественно-резистентных штаммов для адекватной антибиотикотерапии и контроля распространения эпидемически значимых штаммов. Особое внимание необходимо уделять контролю чистоты рук медперсонала, санитарному состоянию процедурного кабинета, чистоты растворов для инструментов, бронхоскопов и других приборов, контролю санитарного состояния палаты и санузла.

В настоящее время утверждены меры по профилактике перекрестной инфекции в "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" СанПиН 3.3686-21, которые посвящены оказанию стационарной медицинской помощи больным муковисцидозом (МВ) в специализированных отделениях или центрах [182]. Наши исследования

подтвердили необходимость соблюдения пунктов 4077-4084, указанных в СанПиН 3.3686-21. Анализ результатов микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, у больных с МВ показал необходимость внесения дополнительного ограничения для данной категории больных в пункте 4084 СанПиН 3.3686-21 «Амбулаторный прием пациентов с МВ и высевам из мокроты бактерий *Burkholderia cepacia complex*, метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter spp.*, а также нетуберкулезных микобактерий должен вестись с разобщением приема от других больных МВ по времени (специальный день) или месту (в отдельном боксе с отдельным входом)» [182]. А именно, добавить в перечень бактерий, высеваемых из мокроты, бактерии *P. aeruginosa*, учитывая, что у пациентов с МВ в РФ могут длительно персистировать генотипы ST 235, ST 274, ST 794, а также изоляты *P. aeruginosa*, имеющие гены металло-β-лактамаз, так как они имеют эпидемическое значение (обладают множественной резистентностью к антибактериальным препаратам и имеют госпитальное происхождение).

Изучение чувствительности бактерий *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам подтвердило обязательное исследование эффективности ДС и контроль за режимами применения. Наши исследования показали, что обработку 70% этиловым спиртом медицинских перчаток и пластика необходимо проводить в течение не менее 45 сек. В качестве дезинфицирующих растворов могут быть использованы на основе ЧАС, гуанидина и ПАВ, а также хлорсодержащий ДС, показавшие свою эффективность в ходе нашего исследования, соответствуют инструкции по применению, в отличие от других. Эти дезинфицирующие средства могут быть рекомендованы и для дезинфекции керамической плитки внутри помещений ЛПУ.

Клинический мониторинг необходимо проводить лечащим врачам постоянно для оценки периодов обострения и эффективности лечения у пациентов с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, не реже 1 раза в 3 месяца, что было

учтено в настоящем исследовании при разработке микробиологического мониторинга.

Выявленные домашние очаги инфекции, факторы передачи бактерий *P. aeruginosa*, показали необходимость проведения мониторинга домашней среды для профилактики ХИЛ у пациентов с МВ. Исследование условий быта позволило разработать рекомендации для родителей по профилактике инфицирования пациентов бактериями *P. aeruginosa* в связи с тем, что дезинфекция небулайзеров и раковин является недостаточно эффективной. По сравнению с разделами Клинических рекомендации – Кистозный фиброз (муковисцидоз) – 2021-2022-В [180], (посвященных профилактики перекрестной инфекции), необходимо осуществлять исследования в домашней среде. В рекомендации для дезинфекции домашней среды детей с МВ внесены следующие пункты:

1. Для ухода за небулайзерами необходимо использование моющих и дезинфицирующих средств.
2. В случае дезинфекции спиртом использовать 70% этиловый спирт.
3. Необходимо дезинфицировать сливы раковин в течение ночи (3-8 часов) и периодически менять ДС.
4. Пластиковую посуду (детские пластиковые бутылочки) и детские принадлежности требуется тщательно мыть и не использовать более гарантийного срока службы - 1 месяц с момента начала использования (указанный производителем).
5. Фильтры компрессора небулайзеров и зубные щетки требуется часто заменять при использовании пациентами с МВ.

Таким образом, профилактические мероприятия крайне необходимы для предотвращения распространения *Pseudomonas aeruginosa* и предупреждения инфицирования больных. Поэтому мониторинг должен включать не только бактериологические исследования, но и мониторинг антибиотикорезистентности штаммов, включающий выявление генов MβL, мониторинг чувствительности к

дезинфектантам с целью коррекции режимов дезинфекции, а также мониторинг микрофлоры внешней домашней среды.

Заключение

Орфанным заболеваниям в Российской Федерации уделяется особое внимание. Последние работы отечественных ученых были посвящены вопросам, связанным с лечением пациентов с муковисцидозом: определением спектра генетических вариантов гена CFTR для Российской Федерации, разработке комплекс мер лечебной физкультуры, направленных на улучшение показателей физического состояния (включая и моторное развитие) детей раннего возраста с муковисцидозом, совершенствованию методик определения этиологии инфекции респираторного тракта при МВ [183,184,185,130].

В настоящее время полностью заменить мутантный ген нормальной копией нельзя. Развитие генетики и фармацевтических технологий привело к новым возможностям лечения больных муковисцидозом. Появились новые лекарственные средства (потенциаторы и корректоры), восстанавливающие функцию гена CFTR (таргетная терапия). Исследования, проводившиеся в 187 центрах Северной Америке, Европы и Австралии показали, улучшение функции легких, снижение частоты обострений, требующих госпитализации, и внутривенной антибактериальной терапии [186]. Однако разработанные лекарственные препараты подходят только для пациентов с определенными типами мутаций гена CFTR. Лечение данными препаратами являются дорогостоящим и поэтому в настоящее время недоступным для большинства пациентов в РФ. [187,188].

Несмотря на достижения медицины в лечение с МВ, инфекционное поражение легких является главной причиной тяжелого течения и смертности при муковисцидозе [189]. Бактерии *P. aeruginosa* продолжают оставаться одним из доминирующих возбудителей инфекции легких у больных МВ. Частота хронического инфицирования *P. aeruginosa* в последние 10 лет не уменьшилась, а напротив наблюдается тенденция к росту: 2012 г составляла 30.8%, в 2016 – 31.6%, в 2021 г – 33.6% [3].

Для предупреждения развития хронической инфекции, вызываемой бактериями *P. aeruginosa*, большое значение имеет своевременный поставленный микробиологический диагноз у пациентов с муковисцидозом. Точная диагностика необходима для профилактики и адекватного назначения антибиотикотерапии: правильный выбор и способ введения антимикробного препарата. На практике микробиологи преимущественно сталкиваются с типичными формами *P. aeruginosa*. Идентификация таких форм не составляет труда благодаря ряду типичных биохимических свойств, выраженному пигментообразованию и характерному запаху, которые используют в качестве дифференцирующего критерия. Однако данные критерии не всегда применимы для идентификации изолятов *P. aeruginosa* с атипичным фенотипом, выделенных из респираторного тракта пациентов с МВ - мукоидных, не продуцирующих пигмент и не имеющих запаха, характеризующихся медленным ростом, когда стандартное время инкубации (24-48 ч.) посевов является недостаточным. Наличие атипичных свойств может привести к ложноотрицательному результату при диагностике, а использование коммерческих биохимических тестов не всегда дает верную идентификацию [190]. Это показало необходимость усовершенствования алгоритма микробиологической диагностики хронической инфекции легких, вызванной *P. aeruginosa*.

Целью работы являлось определить микробиологические и эпидемиологические характеристики хронической инфекции легких у пациентов с МВ, вызванной *P. aeruginosa*, и разработать схему микробиологического мониторинга для адекватной диагностики, профилактики и лечения.

Для достижения цели были поставлены задачи исследования, заключающиеся в проведении микробиологического мониторинга у пациентов с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, характеристике пациентов и описании структуры ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa* (моноинфекция, смешанная инфекция). Наряду с этим необходимо было изучить биологические свойства штаммов *P. aeruginosa* от больных муковисцидозом из собранной коллекции, определить генотипы

персистирующих штаммов *P. aeruginosa*, отслеживать антибиотикорезистентность изолятов *P. aeruginosa*, и изучить распространенность генов металло-β-лактамаз. Одной из главных задач являлось определение значения окружающей домашней среды пациентов с МВ, как резервуара инфекции, выявление факторов передачи бактерий *P. aeruginosa* и эффективность профилактических мероприятий в домашних условиях, а также исследование чувствительности штаммов к дезинфектантам. Для этого необходимо было определить необходимые этапы и их последовательность для усовершенствования микробиологического мониторинга.

Проанализированы сведения по анкетным данным о смертельных исходах у 331 пациента МВ с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, с 2005 по 2023 год. Выявлено, что за период исследования у 23 (7%) пациентов с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, смерть наступила в возрасте от 4 до 24 лет.

Для снижения инфицирования и предупреждения тяжелых осложнений, приводящих к смертельным исходам, необходима своевременная и точная идентификация как типичных, так и нетипичных форм *P. aeruginosa*. На важность выявления раннего инфицирования также указывают работы исследователей Li Z., Kosorok M.R.; Lebecque P., Leal T. [191,192]. Для правильной идентификации *P. aeruginosa* атипичного фенотипа в данной работе мы предложили алгоритм микробиологической диагностики ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*.

В ходе проведенного исследования были определены микробиологические и эпидемиологические характеристики, касающиеся инфекционных осложнений легких, вызванных *P. aeruginosa* у детей больных с МВ. А именно: а) у детей диагноз муковисцидоз был установлен при рождении только в 36 % случаев; б) наиболее часто встречалась мутация гена CFTR 508 del/508del, которая была выявлена у 39.2% пациентов; в) первый высеv бактерий *P. aeruginosa* наблюдали в возрасте от 9 месяцев до 16 лет, а также фиксировали увеличение титра бактерий в течение 6 мес с 1 КОЕ до 10^5 ; г) доля моноинфекции *P. aeruginosa* составляла 41% у детей и 30% у взрослых; д) среди детей инфекция, вызванная

P. aeruginosa, в ассоциации с другими микроорганизмами, составила 59%, среди взрослых - 70%; е) наиболее частым ассоциантом у детей является *S. aureus* (50 %), у взрослых - *Bcc* (34%).

Охарактеризована коллекция штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из нижних дыхательных путей детей и взрослых больных муковисцидозом. Показаны характерные фенотипические особенности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ. При исследовании гипермутабельности 9% штаммов *P. aeruginosa* (МВ), выделенных от взрослых и 11% штаммов, выделенных от детей, показали высокую частоту мутаций $(f) \geq 1 \cdot 10^{-6}$, т.е. являлись сильными мутаторами. Именно такие штаммы способны быстро адаптироваться с целью приобретения устойчивости к антибиотикам. Среди изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих муковисцидозом не было выявлено сильных мутаторов. 27 % изолятов *P. aeruginosa* (от пациентов с МВ) имели мукоидный фенотип, 8% изолятов *P. aeruginosa* (с МВ) были медленно растущими, имели колонии SCV–фенотипа. 62% изолятов *P. aeruginosa* были способны образовывать биопленки. Атипичные фенотипы (23.2%) пигменты не продуцировали. Среди изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих муковисцидозом, не обнаружено штаммов атипичного фенотипа.

С помощью молекулярно-генетических методов было выявлено 145 различных генотипа возбудителя хронической синегнойной инфекции у больных муковисцидозом. У 86% пациентов выделяли индивидуальные генотипы, не встречающиеся у других больных с МВ с ХИЛ.

Таким образом, в результате проведенного нами микробиологического мониторинга у пациентов с МВ при ХИЛ были выделены и охарактеризованы 20 сиквенс-типов *P. aeruginosa* (ST233, ST235, ST245, ST273, ST274, ST281, ST381, ST390, ST575, ST612, ST667, ST794, ST 803, ST1050, ST1074, ST2123, ST2390, ST3993, ST4037, ST4038). Среди которых шесть сиквенсов (ST 233, ST235, ST 245, ST 274, ST 273, ST 381) были высококонтагиозными и эпидемически значимыми. Их регистрировали и в других странах у пациентов с МВ.

Данные, полученные нами в результате генетического разнообразия, позволили нам зарегистрировать в международной базе данных MLST три новых генотипа: ST 3993, ST 4037, ST 4038. Также впервые зарегистрирована новая последовательность нуклеотидов седьмой аллели гена TrpE *P. aeruginosa* ST 3993 (компонента I антранилат-синтазы), как TrpE 317. Бактерии *P. aeruginosa* новых сиквенсов были выделены у пациентов с МВ Чувашии, Красноярского края, и Ямало-ненецкого автономного округа (ЯНАО), соответственно. Всего нами зарегистрированы в базу PubMLST данные о 34 изолятах *P. aeruginosa*.

Нами было выявлено распространение международного эпидемического штамма *P. aeruginosa* ST235 в 2012 году у 5-пациентов, проходивших лечение в РДКБ с марта по июнь - выявлена вспышка.

В ходе нашей работы с помощью методов ПЦР, MLST и полногеномного секвенирования установлена персистенция бактерий *P. aeruginosa* в нижних дыхательных путях больных муковисцидозом от 6 мес. до 15 лет

При исследовании изолятов в динамике нами проанализировано изменение показателей антибиотикочувствительности в динамике при хроническом течении инфекции у 27 больных с МВ. Установлено, что в процессе длительной персистенции, в течение более 14 лет, изоляты *P. aeruginosa* приобретали устойчивость к лекарственным препаратам. Так, у пациента А. в 2006 году штамм *P. aeruginosa* был чувствителен ко всем антимикробным препаратам, в 2012 году проявлял устойчивость к двум препаратам (азлоциллину и гентамицину), в 2016 году был резистентным к четырем антибиотикам (имипенему, азлоциллину, гентамицину, тобрамицину), а уже в 2021 году проявлял чувствительность только при увеличенной экспозиции к 2 препаратам, цефтазидиму и цiproфлоксацину, а к остальным 7 антибиотикам был резистентен (азлоциллину, имипенему, цефепиму, гентамицину, офлоксацину, левофлоксацину, тобрамицину). Сравнение полных геномов поздних и ранних изолятов показало, что в процессе развития хронической инфекции в легких бактерии *P. aeruginosa* приобрели гены резистентности к бета-лактамам и

аминогликозидам. Такую же тенденцию наблюдали и итальянские ученые, которые выявили персистенцию в течение 8 лет ST 390 *P. aeruginosa*. Анализ антибиотикочувствительности ранних и поздних изолятов показало увеличение резистентности [193].

Результаты исследования чувствительности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей больных МВ, в результате мониторинга показали, что на современном этапе наибольшую эффективность проявили антимикробные препараты меропенем, тобрамицин и колистин. Колистин также проявил высокую эффективность в отношении изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых, а к азтреонаму и пиперациллин-тазобактаму изоляты, выделенные от взрослых были чувствительны при увеличенной экспозиции (Рисунок 4.9, Рисунок 4.10). Было показано, что наибольший процент изолятов от детей и взрослых были чувствительны к колистину 98% и 100%, соответственно.

Для выявления молекулярных основ антибиотикорезистентности провели исследование полных геномов изолятов, выделенных при ХИЛ. При полногеномном секвенировании изолятов *P. aeruginosa* нами были определены гены резистентности к антибиотикам, интегрон 2 класса и гены системы эффлюкса различных семейств, а также мутации в генах - мишенях действия антибиотиков. Выявлено наличие недавно открытого гена *crpP*, кодирующий АТФ-фосфотрансфераза, который инактивирует цiproфлоксацин (у 5 изолятов: 70L, 203-2, 159B, 122-1, 122-2). Гомологичные гены были обнаружены у клинических штаммов энтеробактерий, продуцирующих β -лактамазу расширенного спектра действия (ESBL), что позволяет предположить, что этот новый ген может быть широко распространен среди Enterobacteriaceae [173].

Исследование полных геномов бактерий *P. aeruginosa* в нижних дыхательных путях больных МВ при ХИЛ показало, что наряду с генами резистентности к антибактериальным препаратам, обеспечивающим низкую чувствительность к антибиотикам, важную роль играют различные факторы вирулентности, в том числе система SSTT и система эффлюкса, экспрессия

которой регулируется с помощью регуляторной системы Quorum sensing (QS). У изолята 85В (ST 235) был выявлен ген *EchoU*, имеющий острый цитотоксический эффект на эпителиальные клетки [194]. Ранее на широкой выборке штаммов (выделенных от 751 пациента с МВ) было показано, что только у 7 изолятов выявлены гены *EchoU*, 5 из них, которые относились к ST235 и ST313, характеризовались высокой цитотоксичностью, что подтверждает опасность инфицирования больных МВ внутрибольничными штаммами при госпитализации [195].

У всех 9 секвенированных изолятов были определены гены системы эффлюкса различных семейств MexA-MexB-OpnM. У 7 изолятов (70L, 203-2, 159B, 122-1, 122-2, 341, 443) были определены одновременно гены системы MexE-MexF-OpnN и системы эффлюкса семейства MexC-MexD-OpnJ. Экспрессия различных генов семейств систем эффлюкса, контролируемая системой QS, способна усиливать устойчивость к антибиотикам [196].

С помощью полногеномного секвенирования показано наличие в геноме позднего изолята *P. aeruginosa* 85В интегрона 2 класса с генами *sul1*, *dfrB5*, определяющими устойчивость к сульфонамиду и триметоприму, и ген *qacEdelta1* - к ЧАС. Вероятно, что этот интегрон был приобретен в процессе горизонтального переноса гена в процессе персистенции в течение 12 мес.

В ходе работы исследована распространённость генов металло-β-лактамаз *P. aeruginosa*. Полученные данные MLST-типирования изолятов *P. aeruginosa* (МВ и НеМВ), у которых были обнаружены гены MβL Vim типа, показало, что они принадлежат к ST 111, ST 654, ST 235. Что подтверждает результаты исследования Склееновой Е. Ю. с коллегами, которые выявили ограниченное разнообразие генотипов карбапенемазо-продуцирующих клинических изолятов *P. aeruginosa* на территории России (ST 235, ST 654, ST 111, ST 244, ST 313) [38].

Гены mβL VIM типа нами были обнаружены у изолятов *P. aeruginosa*: в 10% случаев у детей и у 4.3% у взрослых с МВ. Данные изоляты были множественно резистентными и 4 из них относились к эпидемическому сиквенс-типу ST235.

Таким образом, наличие у штаммов *P. aeruginosa* генов mβL VIM типа можно охарактеризовать как эпидемические маркеры. Учитывая то, что пациенты с МВ страдают от ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, то они могут быть источником эпидемически значимых штаммов, представляющих опасность для других пациентов с МВ, что указывает на необходимость соблюдения мер профилактики для предупреждения перекрестного инфицирования, как и для бактерий ВСС, что необходимо добавить в клинические рекомендации.

Ранне нами было показано, что антибиотикотерапия при синегнойной инфекции приводит к эрадикации бактерий *P. aeruginosa* только в 41% случаев, а у 59% пациентов развивается хроническая инфекция [197]. Проведенный микробиологический мониторинг показал, что 43% мультирезистентных изолятов было выделено у детей и 61% – у взрослых. Кроме того, штаммы *P. aeruginosa* могут обладать резистентностью к дезинфектантам. Было проведено исследование чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к дезинфектантам. К 70% этиловому спирту при экспозиции 45 сек были чувствительны 100% (67) изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от трех групп пациентов детей с МВ, взрослых с МВ и пациентов неМВ.

Исследование показало, что заявленный производителем режим обеззараживания дезинфектанта на основе ЧАС и альдегида (Миродез Универ) оказался недостаточным для изолятов всех трех исследованных групп штаммов *P. aeruginosa*, включая множественнорезистентный штамм *P. aeruginosa* ST235, имеющий эпидемическое значение. 100% чувствительность изолятов *P. aeruginosa* была достигнута для Миродез Универ при увеличении концентрации в 2,5 раза по сравнению с заявленной производителем.

Заявленные производителями режимы обеззараживания дезинфектанта «Изумруд» на основе ЧАС, гуанидина и ПАВ и хлорсодержащего ДС «Торихлор» были эффективны в отношении 100% изолятов *P. aeruginosa* трех групп пациентов.

100 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных неМВ, 90 % изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от больных ДМВ, и 96 % изолятов от пациентов ВМВ были чувствительны к «Изумруд» с концентрацией С=0.4%. Среди штаммов, для обеззараживания которых требовались большие концентрации ДС (0.5%), был изолят 167, выделенный от больной В., который характеризовался наличием металло-β-лактамаз VIM-типа.

Нами выявлена фенотипическая гетерогенность генотипически идентичных изолятов не только по отношению к антибиотикам, но и к дезинфицирующим средствам.

Высокое генетическое разнообразие указывает на то, что источником инфекции для больных муковисцидозом являются не только другие пациенты с МВ и окружающие больничные объекты, но окружающая внебольничная среда.

Для профилактики инфицирования и предупреждения повторного инфицирования бактериями *P. aeruginosa* проводили исследование микрофлоры окружающей домашней среды больных детей МВ с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, вне стационара. В результате нами были выявлены домашние очаги *P. aeruginosa*. При этом основными резервуарами являлись сливы раковин. Циркуляция бактерий *P. aeruginosa* в окружающей домашней среде у больного ребенка с МВ может привести к повторному инфицированию после антибактериальной терапии. В результате эрадикация *P. aeruginosa* может оказаться неэффективной. Кроме того, мы показали, что зубные щетки и небулайзерные маски при их ненадлежащем уходе также могут быть факторами передачи, что может способствовать реинфицированию. С фильтров компрессора небулайзеров и зубных щеток выделяли также *A. lwoffii*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* и *S. aureus*, которые могут инфицировать легкие больного МВ, в том числе в ассоциации с *P. aeruginosa*.

Исследования эффективности дезинфекции небулайзеров и раковин в обследованных семьях показали, что они являются недостаточными. После проведения дезинфекции с поверхности 25% объектов небулайзера высевались

микроорганизмы. Эффективность дезинфекции сливов наблюдали при раковинной обработке в течение ночи (т.е. более 3-8 часов).

Таким образом, показано, что для предупреждения распространения резистентных изолятов и предотвращения вспышечной заболеваемости больных МВ эпидемически значимыми клонами *P. aeruginosa* необходимо исследовать и осуществлять контроль их устойчивости к дезинфицирующим средствам, а также мониторировать режимы дезинфекции. Нами разработаны рекомендации родителям для увеличения эффективности профилактических мер в домашних условиях.

На основе полученных данных разработана схема микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной бактериями *P. aeruginosa* (Рисунок 41, глава 7.1). Мониторинг должен включать не только бактериологические исследования с целью идентификации, но и мониторинг антибиотикорезистентности штаммов, включающий выявление генов МβЛ, мониторинг чувствительности к дезинфектантам с целью коррекции режимов дезинфекции, а также мониторинг микрофлоры внешней домашней среды.

Усовершенствован алгоритм диагностики ХИЛ, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*. В алгоритм микробиологической диагностики *P. aeruginosa* внесены исследование генов антибиотикорезистентности МβЛ-маркеров эпидемически значимых штаммов и для точной идентификации *Pseudomonas aeruginosa* с атипичным фенотипом увеличение времени инкубации и обязательное использование методов Maldi-TOF, ПЦР (Рисунок 42, глава 7.1).

Необходимо осуществлять персонализированный подход при профилактике и лечении пациентов с МВ в зависимости от микробиологического статуса нижних дыхательных путей, меняющихся показателей состава ассоциаций *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами, наличии моноинфекции, изменения данных антибиотикограмм, выявления генов резистентности и обнаружения эпидемических клонов *P. aeruginosa*.

Мониторинг ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, необходим всем врачам различных специальностей, работающим с пациентами с муковисцидозом. Мониторинг позволит проводить эффективную диагностику, лечение и профилактические мероприятия для пациентов с МВ, что приведет к улучшению качества жизни и увеличению продолжительности жизни пациентов с муковисцидозом.

Выводы.

1. В результате исследования 3900 образцов биологического материала в течение 10 лет микробиологического мониторинга у 636 пациентов с МВ (525 детей и 111 взрослых) были выделены штаммы *P. aeruginosa*, циркулирующие на территории Российской Федерации, собрана и охарактеризована коллекция *P. aeruginosa*, включающая 402 штаммов.
2. Показано, что среди изолятов, выделенных от пациентов с МВ, преобладают клоны высокого эпидемического риска ST233, ST 235, ST245, ST274, ST273, ST381. Выявлены новые генотипы ST4037, ST3993, ST4038 *P. aeruginosa*, обнаруженные только среди изолятов от пациентов с МВ.
3. По результатам генотипирования в международную базу PubMLST по РФ аннотированы сведения о 34 изолятах *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ.
4. При сравнении изолятов *P. aeruginosa* от больных с МВ и больных контрольной группы, выявлена фенотипическая гетерогенность в популяции *P. aeruginosa* от пациентов с МВ. В том числе, изоляты, выделенные от пациентов с МВ демонстрируют в 23 % атипичные фенотипы, в 47 % – множественную устойчивость к антибиотикам. Среди бактерий, выделенных от контрольной группы больных (без МВ), изолятов *P. aeruginosa* с атипичным фенотипом не выявлено, множественной устойчивостью к антибиотикам обладали 11%.
5. Выявлены домашние очаги инфекции *P. aeruginosa* и показана роль объектов внешней среды, включая раковины, небулайзеры и другие предметы домашнего обихода, как резервуаров и факторов передачи возбудителя. Показано, что 60 % изолятов от больных муковисцидозом демонстрируют устойчивость к дезинфектантам при рекомендованных производителем режимах применения.
6. В целом, полученные данные позволяют усовершенствовать схему микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, для диагностики, лечения и профилактики ХИЛ у пациентов с МВ, на основе

использования методов Maldi-TOF или ПЦР для идентификации *P. aeruginosa* с атипичным фенотипом, фено- и генотипического мониторинга антибиотикорезистентности, мониторинга чувствительности к дезинфектантам, мониторинга микрофлоры внешней домашней среды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БП - биопленки

ГПГ - горизонтальный перенос генов

МВ – муковисцидоз (кистозный фиброз)

МО - медицинская организация

НФМО - неферментирующий микроорганизм

н.п. - нуклеотидные пары

НеМВ - пациенты, не страдающие муковисцидозом

ОП - оптическая плотность

ПЦР (PCR) - полимеразная цепная реакция

ПЦР-РеалТайм («Real-time», rtPCR) - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПДФР - полиморфизм длины фрагментов рестрикции

РФ – Российская Федерация

СЗФО – Северо-западный федеральный округ

СЭ – система эффлюкса

УПМ - условно-патогенный микроорганизм

ФГБНУ «МГНЦ» - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

ФМБА - Федеральное медико-биологическое агентство

ФНЦТИО - Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов

ХИЛ – хроническая инфекция легких

ЦФО – центральный федеральный округ

ЧАС - Четвертичные аммониевые соединения

ЮФО – южный федеральный округ

ВСС - Burkholderia cepacia complex

CF (cystic fibrosis) — кистозный фиброз

CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) – муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости)

MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight) - масс-спектрометрия времяпролетная с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

MLST (Multilocus sequence typing)-мультилокусное секвенирование

M β L - гены металло- β -лактамаз

LD50 (lethal dose, 50%) - средняя летальная доза, вызывающая гибель половины подопытных животных.

QS (quorum sensing) — кворум-сенсинг

SSTT – система секреции третьего типа

RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA – Polymerase chain reaction)

SCV (small colony variant) – фенотип мелких колоний

ST (sequence type) - сиквенс-тип

WGS - полногеномное секвенирование

Список литературы

1. The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). (URL: <https://cftr2.org>)
2. Sosnay P.R. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene / Sosnay P.R., Siklosi K.R., Van Goor F. // Nature Genetics. – 2013. – V.45, №10. – P.1160–1167.
3. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год. / С.А. Красовский, М.А. Старинова, А.Ю. Воронкова, Е.Л. Амелина, Н.Ю. Каширская, Е.И. Кондратьева, Л.П. Назаренко – М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2023. – 95 с.
4. Hoiby N. Recent advances in the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis // BMC Medicine. – 2011. – V.9. – P.32.
5. Кондратьева И.И. Муковисцидоз у детей и взрослых. Взгляд в будущее / Кондратьева И.И., Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Шерман В.Д. // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2014. – № 4. – С. 142-144.
6. Амелина Е.Л. Муковисцидоз: современный подход к диагностике и лечению / Амелина Е.Л., Чучалин А.Г. // Русский медицинский журнал. – 1997. – Т. 5, № 17. – С. 1136-1142.
7. Приказ № 185 от 22 марта 2006 г. О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания // Педиатрическая Фармакология. – 2006. – №3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/prikaz-185-ot-22-marta-2006-g-o-massovom-obsledovanii-novorozhdennyh-detey-na-nasledstvennye-zabolevaniya> (дата обращения: 17.09.2024).
8. Ашерова И. К. Регистр как средство улучшения качества медицинской помощи больным муковисцидозом / Ашерова И. К., Капранов Н.И. // Педиатрическая фармакология. – 2012. – Т. 9, №3. – С. 96-100.
9. Кондратьева Е.И. Характеристика муковисцидоза в разных регионах России / Кондратьева Е.И., Ильенкова Н.А., Хачиян М.М., Брисин В.Ю., Красовский

- С.А., Чикунов В.В., Черняк А.В., Лягуша Д.Э., Воронкова А.Ю., Шерман В.Д., Горинова Ю.В. // Практическая пульмонология. – 2018. – №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-mukovistsidoza-v-raznyh-regionah-rossii> (дата обращения: 06.05.2024).
10. Капранов Н. И. Муковисцидоз: современные аспекты диагностики и лечения / Капранов Н. И., Радионович А.М., Каширская Н.Ю., Толстова В.Д. // Клиницист. – 2006. – №4. – С.42-51.
 11. Муковисцидоз (клиническая картина, диагностика, лечение, реабилитация, диспансеризация): учебное пособие для врачей // А. В. Орлов, О. И. Симонова, Е. А. Рославцева, Д. И. Шадрин. - СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2014 – 160с.
 12. Cystic Fibrosis Foundation. 2009. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2008 annual data report. (URL: <http://www.cff.org>).
 13. Gangell C. Inflammatory responses to individual microorganisms in the lungs of children with cystic fibrosis / Gangell C., [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2011. – V.53, № 5. – P. 425-32.
 14. Шагинян И.А. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом / Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю. [и др.] // ЖМЭИ. -2010.-N.1.- С.15-20.
 15. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А. Микробиологическая диагностика при легочных заболеваниях/ Респираторная медицина: руководство / под редакцией А. Г. Чучалина. - М.: Литтера, 2017. - Том.1. - 464 с.
 16. Ciofu O. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants / Ciofu O., Mandsberg L.F., Bjarnsholt T., Wassermann T., Hoiby N. // Microbiology. – 2010. – V. 156.– P. 1108-1119.
 17. Smith E.E. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients / Smith E.E, [et al.] // Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – V.103. – P.8487-8492.
18. Hoiby N. Cystic Fibrosis (out of print) / Edited by A.K. Webb and F.A. Ratjen Book, 2006. – P. 66–78.
 19. Courtney J. M. Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis / Courtney J. M., J. Bradley, J. McCaughan, [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* – 2007. – V.42. – P.525–532.
 20. Nixon G.M. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis / Nixon G.M., Armstrong DS, Carzino R., [et al.] // *The Journal of Pediatrics.* – 2001. – V.138 – P. 699-704
 21. Emerson J. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis / Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B., [et al.] // *Pediatric Pulmonology.* – 2002. – V. 34 – P. 91-100.
 22. Konstan M. W. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis / Konstan M. W., [et al.] // *The Journal of Pediatrics.* – 2007. – V.151. – P.134-139.
 23. Покровский В. И. Медицинская микробиология/ Покровский В. И., Поздеев О. К. - М.: ГЭОТАР-Медицина, 1999. – 1184 с.
 24. Bergan T. Pathogenetic factors of *Pseudomonas aeruginosa* // *Scandinavian journal of infectious diseases.* – 1981. – V.29. – P.7-12.
 25. Silva M. E. Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water / Silva M. E., Filho I. C., Endo E.H., Nakamura C. V., Ueda-Nakamura T., Filho B.P. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2008. – V.93. – №4. – P.323-34.
 26. Воробьев А. А. Микробиология/ Воробьев А. А., Быков А. С., Пашков Е. П., Рыбакова А. М. – 2-е изд. – М.: Медицина, 2003. – 335 с.
 27. Медицинская микробиология/ Покровский В.И. – 4 е изд., стереот. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2010. – 768 с.

28. Nadel D.M. Endoscopically guided cultures in chronic sinusitis / Nadel D.M, Lanza D.C, Kennedy D.W. // American journal of rhinology. – 1998. – V.12– P.233–241.
29. Mansoor T. Pseudomonas aeruginosa in chronic suppurative otitis media: sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi / Mansoor T., Musani M.A., Khalid G., Kamal M. // The Journal of Ayub Medical College Abbottabad 2009. – V.21. – №2– P.120-3.
30. Augustin P. Pseudomonas aeruginosa post-operative peritonitis: clinical features, risk factors, and prognosis / Augustin P., Tran-Dinh A., Valin N., [et al.] // Surgical Infections. – 2013. – V.14. – №3. – P.297-303.
31. Kabiri M., Barkat A., [et al.] Neonatal epididymo-orchitis caused by Pseudomonas aeruginosa: a case report // Cases Journal. – 2010. – V.3. – №1– P.44.
32. Wagenlehner F.M. Bacterial prostatitis / Wagenlehner F.M., Pilatz A., [et al.] // The World Journal of Urology. – 2013. – V.31– №4. – P.711-6.
33. Фоминых С.Г. Раневые инфекции: значение микробиологического мониторинга при составлении больничного формуляра антимикробных препаратов // Клин микробиол антимикроб химиотер. – 2011. – V.13. – №4. – P.368-75.
34. Guggenheim M. Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms: a 20-year study (1986-2005) / Guggenheim M., Zbinden R., Handschin A.E., [et al.] // Burns. – 2009. – V.35. – №4. – P.553-60.
35. Андреева С.В. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран пациентов Челябинского областного ожогового центра / Андреева С.В., Бахарева Л.И., Нохрин Д.Ю. // Вестник Челябинского государственного университета. – 2013. – №.7– С.58-9.
36. Nseir S. Impact of appropriate antimicrobial treatment on transition from ventilatorassociate tracheobronchitis to ventilator-associated pneumonia / Nseir

- S., Martin-Loeches I., Makris D., Jaillette E., [et al.] // *Critical Care*. – 2014. – V.18. – №3. – P.129-130.
37. Chastre J. Ventilator-associated pneumonia / Chastre J., Fagon J.Y. // *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2002. – V.165, №7– P.867-903.
 38. Склеенова Е.Ю. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов / Склеенова Е.Ю., Азизов И.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В. // *КМАХ*. – 2018. – №3. – URL:<https://cyberleninka.ru/article/n/pseudomonas-aeruginosa-v-rf-istoriya-odnogo-iz-naibolee-uspeshnyh-nozokomialnyh-patogenov> (дата обращения: 18.09.2024).
 39. Gaynes R. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli / Gaynes R., Edwards J.R. // *Clin Infect Dis*. – 2005. – V.41. – P.848–854.
 40. Hidron A.I. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 / Hidron A.I, Edwards J.R, Patel J., Horan T.C, [et al.] // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 2008. – V.29. – P.996–1011.
 41. Streit J.M. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001) / Streit J.M., Jones R.N., Sader H.S., [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2004. – V.24. – P.111–118.
 42. Vincent J.L. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units / Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2009. – V.302. – P.2323–2329.
 43. История микробиологии/ Шлегель Г.Г. – М.: УРСС, 2002. – 302 с.
 44. The *Pseudomonas* Genome Database. (URL: <https://www.pseudomonas.com/>)

45. Stover C.K. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen / Stover C.K, Pham X.Q, Erwin A.L, [et al.] // *Nature*. – 2000. – V.406. – №6799. – P.959-64.
46. Botzenhart K. Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen / Botzenhart K., G. Doring // Plenum Press, New York. – 1993. – P.1-18.
47. Burns J. L., Gibson R. L., McNamara S., Yim D., Emerson J., [et al.] Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis // *Journal of Infectious Diseases* – 2001. – V.183. – P.444-452.
48. Romling, U. Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients / Romling, U., A. Kader, D. D. Sriramulu, R. Simm, [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2005. – V.7. – P. 1029-1038.
49. Romling U. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats / Romling, U., J. Wingender, H. Muller, [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – V.60. – P. 1734-1738.
50. Speert D. P. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada / Speert D. P., Campbell M. E., Henry D. A., [et al.] // *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2002. – 166 – P. 988-993.
51. Mainz G. Concordant genotype of upper and lower airways *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates in cystic fibrosis / Mainz G., Naehrlich L., Schien M., Kading M., [et al.] // *Thorax*. – 2009. – V.64. – P. 535-540.
52. Engel J. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by non-phagocytic cells. *Pseudomonas: A model system in Biology* / Engel J., Ramos J.L, Filloux A. – New York: Springer. – 2007. – P.343–368.
53. Feldman M. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection / Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1998. – V.66. – P. 43–51.

54. Dasgupta N. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* / Dasgupta N., Wolfgang M.C., Goodman A.L., [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2003. – V.50. – P. 809–824.
55. Mattick J.S. Type iv pili and twitching motility // *Annual Review of Microbiology* – 2002. – V.56. – P. 289–314.
56. Engel J. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease / Engel J., Balachandran P. // *Current Opinion in Microbiology*. – 2009. – V.12. – P. 61–66.
57. Sadikot R.T. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia / Sadikot R.T., Blackwell T.S., Christman J.W., [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2005. – V.171. – №11. – P. 1209-23.
58. Roy-Burman A. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections / Roy-Burman A, Savel R.H, Racine S., Swanson B.L, Revadigar N.S, Fujimoto J, [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2001. – V.183. – P. 767-1774.
59. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response // *Journal of Intensive Care*. – 2014. – P. 2-10.
60. Ratjen F. Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis / Ratjen F., [et al.] // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2006. – V.12. – P.428–432.
61. Jones A.M. Eradication therapy for early *Pseudomonas aeruginosa* infection in CF: many questions still unanswered // *European Respiratory Journal*. – 2005. – V.26. – P. 373–375.
62. Nguyen D. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections / Nguyen D., Singh P.K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V.103. – P.8305–8306.
63. Hoboth C. Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis /

- Hoboth C., Hoffmann R., Eichner A., [et al.] // Journal of Infectious Diseases. – 2009. – V.200. – P.118–130.
64. Smith E.E. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients / Smith E.E., Buckley D.G., Wu Z., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – V. 103. – P.8487–8492.
 65. Govan J.R. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* / Govan J.R., Deretic V. // Microbiology Reviews – 1996. – V.60. – P.539–574.
 66. Moreau-Marquis S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway / Moreau-Marquis S., Stanton B.A., O'Toole G.A. // Pulmonary Pharmacology and Therapeutics – 2008. – V.21. – P.595–599.
 67. Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients / Bjarnsholt T., Jensen P., Fiandaca M. J., [et al.] // Pediatric Pulmonology. – 2009. – V.44. – №6. – P.547-58.
 68. Ciofu O. Investigation of the *algT* operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants / Ciofu O., Lee B., Johannesson M., [et al.] // Microbiology. – 2008. – V.154, №1. – P.103-13.
 69. Gacesa P. Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and future prospects // Microbiology. – 1998. – V.144. – №5. – P.1133–1143
 70. Stokke B.T. Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate Gels. 1. Ca-Alginate Gels / Stokke B.T, Draget K.I, Smidsrod O, Yuguchi Y, [et al.] // Macromolecules. – 2000. – V.33, №5. – P.1853–1863.
 71. Iglewski B.H. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin / Iglewski B.H., Kabat D. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1975. – V.72.– P.2284–2288
 72. Hamood A. N. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A synthesis. In *Pseudomonas: Virulence and Gene Regulation* / Hamood A. N., Colmer-Hamood

- J. A., Carty, N.L. – 2004. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9084-6_14.
73. Lee H. Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and Pseudomonas toxin A / Lee H., Iglewski W.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1984. – V. 81. – P. 2703-2707.
 74. Liu P.V. Changes in somatic antigens of Pseudomonas aeruginosa induced by bacteriophages // *Journal of Infectious Diseases*. – 1969. – V. 119. – P. 237-246.
 75. Fogle M.R. Anti-ETA IgG neutralizes the effects of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. / Fogle M.R., Griswold J.A., Oliver J.W., Hamood A.N. // *Journal of Surgical Research*. – 2002. – V. 81. – P. 86-98.
 76. Storey D.G., Ujack E.E, Rabin H.R, Mitchell I. Pseudomonas aeruginosa lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis // *Infection and Immunity*. – 1998. – V. 66. – №6. – P. 2521-8.
 77. K. Wooldridge. Bacterial Secreted Proteins: Secretory. Mechanisms and Role in Pathogenesis // *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. – 2009. – V. 7, №6. – P. 691–693.
 78. Ostroff R.M. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa / Ostroff R.M., Vasil A.I., [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1990. – V.172. – P. 5915–5923.
 79. Matthew L. Phenotypic Heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa Populations in a Cystic Fibrosis Patient Published / Matthew L. Workentine, Christopher D. Sibley // *Plos One*. – 2013. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060225>
 80. Wargo M.J. Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during Pseudomonas aeruginosa infection / Wargo M.J., Gross M.J., Rajamani S., Allard J.L., [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2011. – V.184. – №3. – P.345-54.

81. Abdel-Mawgoud A.M. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles / A.M. Abdel-Mawgoud, F. Lepine, E. Deziel // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 86, №5. – P. 1323-1336.
82. Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production / Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramírez M., Sánchez R. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – V.32. – №12. – P.675-677.
83. Maier R.M. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications / Maier R.M., Soberón-Chávez G. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – V.54. – №5. – P.625-33.
84. Guerra-Santos L. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source / Guerra-Santos L., Käppeli O., Fiechter A. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1984. – V.48. – № 2. – P. 301–305.
85. Hassett D.J. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets / Hassett D.J., Cuppoletti J., Trapnell B., [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2002. – V.54. – P. 1425–1443.
86. Worlitzsch D. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients / Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – V.109. – P. 317–325.
87. Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis / Yoon S.S., Hennigan R.F., Hilliard G. M., [et al.] // *Developmental Cell*. – 2002. – V.3. – P. 593–603
88. L. Lamont. Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis / L. Lamont, A.F. Konings, D.W. Reid // *BioMetals*. – 2009. – V. 22. – №1. – P. 53–60.

89. Peek M.E. Pyoverdine, the major siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, evades NGAL recognition / Peek M.E., Bhatnagar A, McCarty N.A., [et al.] // *Int. Perspectives Inf. Dis.* – 2012. – V.2012. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://doi.org/10.1155/2012/843509>
90. Visca P. Review Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance / Visca P., Imperi F., Lamont I.L. // *Trends Microbiol.* – 2007. – V.15. – №1. – P. 22-30.
91. Hentzer M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors / Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., Riedel K., [et al.] // *J EMBO.* – 2003. – V. 22. – P. 3803–3815.
92. Schuster M. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis / Schuster M., Lostroh C.P., Ogi T., Greenberg E.P. // *J Bacteriol.* – 2003. – V.185. – P. 2066–2079.
93. Wagner V.E. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment / Wagner V.E., Bushnel, D., Passador L., [et al.] // *J Bacteriol.* – 2003. – V. 185. – P. 2080–2095.
94. Henrici A.T. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique // *Journal of Bacteriology.* – 1933. – V.25. – P. 277–287.
95. ZoBell, C.E. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity // *Journal of Bacteriology.* – 1943. – V. 46. – P. 39-56.
96. Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral immune response // *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B.* – 1974. – V.82. – P. 551–8.
97. Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* Infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis // *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* – 1977. – V.262. – P.1–96.

98. Costerton J.W. Structure and function of the cell envelope of Gram-negative bacteria / Costerton J.W, Ingram J.M, Cheng K-J. // *Bacteriol Rev.* – 1974. – V.38. – P.87–110.
99. Гостев В.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции / Гостев В.В., Сидоренко С.В. // *Журнал инфектологии.* – 2010. – Т.2. – № 3. – С.4-15.
100. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections // *APMIS.* – 2017. – V.125. – P.272–275.
101. Ильина Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Ильина Т. С., Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. // *Генетика.* – 2004. – Т. 40. – №11. – С.1445-1456.
102. Хмель И.А. Биоплёнки бактерий и связанные с ними трудности медицинской практики // *Вестн. Моск. Ун-та. Биология.* – 2008. – №1. – С.28-35.
103. Ehrlich G.D., Hu F.Z., Shen K., Stoodley P., Post J.C. Bacterial Plurality as a General Mechanism Driving Persistence in Chronic Infections // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2005. – V.437. – P.20–24.
104. Петрухина М.И. Эпидемиологическое значение бактериальных плёнок / Петрухина М.И., Ющенко Г.В., Политова Н.Г. // *Журнал МедиАль.* – 2015. URL:<https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskoe-znachenie-bakterialnyh-plyonok> (дата обращения: 03.07.2024).
105. Bjarnsholt T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients / Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Fiandaca M.J., Pedersen J., Hansen C.R, [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* – 2009. – V.44. – P.547– 558.
106. Boucher H.W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America / Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2009. – V.48. – P.1–12.

107. Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей / Козлов С.Н., Козлов Р.С. – 3-е изд., – перераб. и доп. – М.: МИА, 2017. – 400с.
108. Tillotson G.S. Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility / Tillotson G.S., Zinner S.H // Expert Rev Anti Infect Ther. – 2017. – V.15. – №7. – P. 663-676.
109. Bellini C. Antibiotic resistance: situation in Europe and Switzerland, and impact for the physician / Bellini C., Troillet N. // Rev Med Suisse. – 2016. – V.12. – P. 1699-702.
110. Lai C.C. High burden of antimicrobial drug resistance in Asia / Lai C.C., Lee K., Xiao Y., [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2014. – V.2. – №3. – P. 141-7.
111. Кудмагамбетов И.Р. Современные подходы к контролю и сдерживанию антибиотикорезистентности в мире / Кудмагамбетов И.Р., Сарсенбаева С.С., [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – Т. 9. – №1. – С.54-9.
112. Склеенова Е.Ю. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов / Склеенова Е.Ю., Азизов И.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018. – Т. 20. – №3. – С.164-171.
113. Шагинян И.А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. // Клин. Микробиол. – 2005 – Т. 7. – №3. – С.271-285.
114. Osano E. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance / Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 1994. – V.38. – P.71-8.

115. Cornaglia G. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? / Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M // *The Lancet Infect. Dis.* – 2011. – V.11. – P.381–393.
116. Woodford N. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance / Woodford N., Turton J. F., Livermore D. M. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2011. – V.35. – P.736–755.
117. Queenan A.M. Carbapenemases: the versatile β -lactamases / Queenan A.M., Bush K. // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – V.20. – P. 440–458.
118. Эйдельштейн М.В. Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло- β -лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане / Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Шевченко О. В. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2012. – №2. – С.132-152.
119. Мороз А. Ф. Синегнойная инфекция / А. Ф. Мороз, Анциферова Н. Г., Баскакова Н. В. – Москва: Медицина, 1988. – 254с.
120. Ефремова Н. Н. Влияние уровня антиинфекционной защиты организма и условий внешней среды на структуру популяций *Pseudomonas aeruginosa* по биологическим признакам: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Ефремова Наталья Николаевна. – Санкт-Петербург, 2000. – 133с.
121. Фармацевтическая микробиология / Галынкин В.А., Кочеровец В.И., Габидова А.Э. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Арнебия, 2015. – 240 с
122. Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях. Федеральные клинические рекомендации/ Шкарин В.В., Ковалишена О.В. – М., 2015. – 27с.
123. Lee S. An outbreak of *Pseudomonas* sepsis associated with nosocomial infection in a pediatric ward / Lee S., Shiomi M., Ito N., Togawa M., Maeyama M., [et al.] // *Kansenshogaku Zasshi.* – 1993. – V.67, №4. – P.361-5.

124. Bridier A. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / Bridier A., Dubois-Brissonnet F., Greub G., Thomas V., Briandet R. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2011. – V.55. – №6. – P.2648-54.
125. Lakkis C. The Effect of ion availability on *P. aeruginosa* susceptibility to hydrogel contact lens disinfection / Lakkis C., Fleiszig S. // *Optometry and Vision Science.* – 2001. – V.78, №12. – P.24.
126. Bergan T. Pathogenetic factors of *Pseudomonas aeruginosa* // *Scand J Infect Dis.* – 1981. – V.29. – P.7-12.
127. Чернуха М.Ю. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции лёгких у больных муковисцидозом / Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А. Алексеева Г.В., Авакян Л.В., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Семькин С.Ю., Сиянова Е.А., Медведева О.С., [и др.] // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2014. – Т.16. – №4. – С.278-290.
128. Wellingshausen N. Superiority of molecular techniques for identification of Gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis / Wellingshausen N., Köthe J., Wirths B., Sigge A., [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2005. – V.43. – P.4070-4075.
129. Шагинян И.А. Эпидемиологическая значимость молекулярной изменчивости генома изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих хроническую инфекцию легких у больных муковисцидозом / Шагинян И.А., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Сиянова Е.А., Бурмистров Е.М., Воронкова А.Ю., [и др.] // *КМАХ.* – 2019. – Т.21. – №4. – С.340-351. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskaya-znachimost-molekulyarnoy-izmenchivosti-genoma-izolyatov-pseudomonas-aeruginosa-vyzyvayuschih-hronicheskuyu> (дата обращения: 20.09.2024).
130. Аветисян Л. Р. Хроническая инфекция легких у больных муковисцидозом: этиология, диагностика, эпидемиология и профилактика: дис. ... д-ра мед.

- наук: 14.02.02, 03.02.03/Аветисян Лусине Ремуальдовна. – Москва, 2019. – 285с.
131. Leid J.G. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing / Leid J.G., Willson C.J., Shirliff M.E., Hassett D.J., [et al.] // *J Immunol.* – 2005. – V.175. – №11. – P.7512-8.
 132. Maiden M. C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., Russell J. E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V.95. – P. 3140-3145.
 133. The Main Site PubMLST at the Department of Biology, Oxford University, Great Britain Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. – [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.pubmlst.org>
 134. Cholley P. Most multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types / Cholley P., Thouverez M., Hocquet D., [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2011. – V.49. – №7. – P. 2578-83.
 135. Seok Y., Bae I.K., Jeong S.H., Kim S.H., Lee H., Lee K. Dissemination of IMP-6 metallo-beta-lactamaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 in Korea // *J Antimicrob Chemother.* – 2011. – V.66. – №12. – P. 2791-6.
 136. Воронина О.Л. Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов хирургических отделений ФНЦТИО им. В.И. Шумакова / Воронина О.Л., [и др.] // *КМАХ.* – 2012. – №2. – С.88-99.
 137. Савинова Т.А. Генотипы и носительство металло-бета-лактамаз среди карбапенеморезистентных *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у детей в г. Москве / Савинова Т.А., Лазарева А.В., [и др.] // *КМАХ.* – 2018. – Т. 20. – № 4. – С.370-374.
 138. Эйдельштейн М.В. Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло-β-лактамазы, в

- России, Беларуси и Казахстане / Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Шевченко О.В. // КМАХ. – 2012. – №2. – С.132-152.
139. Cheng K. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic / Cheng K., [et al.] // *Lancet*. – 1996. – V.348, №9028. – P.:639-42.
 140. Silva Filho L.V. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment / Silva Filho L.V., Ferreira F. A., Reis F.J., [et al.] // *J Brasileiro de Pneumologia*. – 2013. – V.39. – №4. – P.495-512.
 141. Yousefi S. A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran / Yousefi S., Nahaei M.R., Farajnia S., [et al.] // *APMIS*. – 2013. – V.121. – №2. – P.146-52.
 142. Jones A.M. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic / Jones A.M., Govan J.R., Doherty C.J., [et al.] // *Lancet*. – 2001. – V.358. – №9281. – P.557-8.
 143. Scott F.W. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales / Scott F.W., Pitt T.L. // *J Med Microbiol*. – 2004. – V.53. – P.609-15.
 144. Jones A.M. Prospective surveillance for *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection at a cystic fibrosis center / Jones A.M., Dodd M.E., Govan J.R., [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2005. – V.171. – P.257–260.
 145. Kidd T.J. *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting / Kidd T.J., Ritchie S.R., [et al.] // *Eur Respir J Published*. – 2012. – V.7. – №9. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044199> (дата обращения: 20.09.2024).
 146. Van Mansfeld R. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types / Van Mansfeld R., Willems R., Brimicombe R., Heijerman H., [et al.] // *J Clin Microbiol*. – 2009. – V.47, №12. – P.4096-101.

147. Aaron S. D. Infection With Transmissible Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and Clinical Outcomes in Adults With Cystic Fibrosis / Aaron S. D., Vandemheen K. L., Ramotar K., [et al.] // JAMA. – 2010. – V.304. – №19. – P.2145-2153.
148. Фурман Е. Г. Стоимость терапии пациентов с муковисцидозом в разных возрастных группах с учетом инфекции дыхательного тракта и осложнений / Фурман Е. Г., Шадрина В. В., Т. Ю. Максимычева Т. Ю., Шерман В. Д., Кондратьева Е. И. – URL: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-238-249> (дата обращения: 04.05.2024).
149. Schelstraete P. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients / Schelstraete P., Van Daele S., De Boeck K., [et al.] // Eur Respir J. – 2008. – V. 31. – №4. – P.822-829.
150. Regnath T. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in households of patients with cystic fibrosis / Regnath T., Kreutzberger M., Illing S., Oehme R., Liesenfeld O. // Int J Hyg Environ Health. – 2004. – V. 207, №6. – P.585-8.
151. Purdy-Gibson M.E. *Pseudomonas aeruginosa* in CF and non-CF homes is found predominantly in drains / Purdy-Gibson M.E., France M., Hundley T.C., Eid N., Remold S.K. / J Cyst Fibros. – 2015. – V. 14. – №3. – P.341-6.
152. Кондратенко О. В. Оценка влияния микрофлоры объектов окружающей среды на возможность внестационарной колонизации дыхательных путей пациентов с муковисцидозом // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2018. – №4. – С.156-164.
153. Приказ Минздрава СССР № 535: Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинικο-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. – Москва, 1985 г.
154. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Электронный ресурс]: метод. указания МУК 4.2.1.1890-04. – URL: <http://www.bestpravo.ru/rossijskoje/jm-gosudarstWy6b.htm>

155. EUCAST Definitive document E. DEF 7.3.2 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/.
156. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://standards.globalspec.com/std/14297781/clsi-m60>
157. Козлов Р.С. Клинические рекомендации: определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам / Козлов Р.С., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Романов А.В., [и др.]. – 2021. – URL: <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/> (дата обращения: 04.05.2024).
158. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay // J. Visualized Experiments. – 2011. – № 47. – P.2437.
159. Oliver A. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection / Oliver A., Canton R., [et al.] // Science. – 2000. – V.288. – P.1251–1254.
160. Kenna D.T. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis / Kenna D.T., [et al.] // J. Microbiology. – 2007. – V.153. – P.1852-9.
161. Шевченко О.В. Методические рекомендации. Металло-бета-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий / Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2007. – V.9, № 3. – P.211–218.

162. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. №92/52-17. – М., 1995.
163. Черкашин Е.А. Исследование распространенности метало-бета-лактамаз в Российской Федерации / Черкашин Е.А., Федорчук В.В., [и др.] // Вестник Московского Университета (Химия). – 2006. – Т. 47. – №3. – С.83-86.
164. Кузнецова М. В. Микробиология нозокомиальной синегнойной инфекции: мониторинг распространенности, биологические особенности возбудителя и новые подходы к диагностике: дис. ... д-ра мед. наук: 03.02.03/ 161. Кузнецова Марина Валентиновна. – Пермь, 2014. – 244с.
165. Методы лабораторных исследований и испытаний медико профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 615 с.
166. Руководство Р 4.2.3676-20 от 18.12.2020. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности.
167. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Федеральные клинические рекомендации. Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях. – М., 2015.- 27 с.
168. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. – М.: Медицина, 1989. – 416 с.
169. Брико Н.И., Покровский В.И. Эпидемиология. – М.: Медиа, 2017. – 368 с.
170. Методические рекомендации. МУК 4.2.2942-11 Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях.
171. Clinical and Laboratory Standards Insitute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational

- Supplement.M100-S22.CLSI, Wayne, PA: 2012. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.sci epub.com/reference/24896>.
172. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST Disk diffusion manual 2013. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.eucast.org/eucast_susceptibility_testing/disk_diffusion_methodology.
 173. Chávez-Jacobo V. Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals / Chávez-Jacobo V., Hernández-Ramírez K.C., Silva-Sánchez J., Garza-Ramos U., [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2019. – V.74, №5. – URL: https://www.researchgate.net/publication/331132500_Prevalence_of_the_crpP_gene_conferring_decreased_ciprofloxacin_susceptibility_in_enterobacterial_clinical_isolates_from_Mexican_hospitals (дата обращения: 19.09.2024).
 174. Botelho J. ICEs are the main reservoirs of the ciprofloxacin-modifying *crpP* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* / Botelho J., Grosso F., Peixe L. // Genes. – 2020. – V.11, №8. – P.889.
 175. Martinez J. L.Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems / Martinez J. L., Sánchez M. B., Martínez-Solano L., [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2009. – V.33, №.2. – P.430–449.
 176. Кузьменков А.Ю. Практика локального мониторинга антибиотикорезистентности в стационарах различных регионов РФ / Кузьменков А.Ю., Виноградова А. Г., Трушин И.В., Козлов Р.С. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2022. – Т.24. – № 1. – С.31-38.
 177. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 2.1.3.2630-10. от 18 мая 2010 г. N 58 Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность.
 178. Шагинян И.А. Современные принципы эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями: триада мониторинга // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 9. – С. 36-37.

179. Шагинян И. А. Консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» раздел «Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции при муковисцидозе» / Шагинян И. А., Чернуха М. Ю., Капранов Н. И., Кондратьева Е. И., [и др.] // Педиатрия. – 2016. №1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/konsensus-mukovistsidoz-opredelenie-diagnosticheskie-kriterii-terapiya-razdel-mikrobiologiya-i-epidemiologiya-hronicheskoy> (дата обращения: 19.09.2024).
180. Аветисян Л.Р. Эпидемиологический надзор за хроническими инфекциями легких, вызванными бактериями *Burkholderia cepacia* complex, бактериями рода *Achromobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* и метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus*, у больных муковисцидозом / Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., Бурмистров Е.М., Медведева О.С., Русакова Е.В., Сиянова Е.А., Кондратьева Е.И., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2020. – №1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskij-nadzor-za-hronicheskimi-infektsiyami-legkih-vyzvannymi-bakteriyami-burkholderia-cepacia-complex-bakteriyami-roda> (дата обращения: 19.09.2024).
181. Клинические рекомендации. Кистозный фиброз (муковисцидоз). 2021-2023. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://mukoviscidoz.org/klinicheskie-rekomendatsii-kistoznyj-fibroz-mukovistsidoz-2020.html>
182. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573660140>
183. Мельяновская Ю.В. Молекулярная эпидемиология муковисцидоза в РФ и комплексная оценка патогенетической роли вариантов гена CFTR на основе изучения функции эпителиальных ионных каналов (ENaC, CFTR, CaCCs): дис. ... канд. мед. наук: 03.02.07 / Мельяновская Юлия Леонидовна. – Москва, 2023. – 237с.

184. Успенская Ю.К. Персонализация методов лечебной физкультуры в медицинской реабилитации детей раннего возраста с муковисцидозом: дис. ... канд. мед. наук: 3.1.33. / Успенская Юлия Константиновна. – Санкт-Петербург, 2023. – 156с.
185. Козлов А.В. Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.07 / Козлов Андрей Владимирович. – Санкт-Петербург, 2023. – 160с.
186. Wainwright C.E. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR / Wainwright C.E., Elborn J.S., Ramsey B.W., [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2015. – V.373, №3. – P.220-231.
187. Куцев С.И. Таргетная терапия при муковисцидозе / Куцев С.И., Ижевская В.Л., Кондратьева Е.И. Таргетная терапия при муковисцидозе // Пульмонология. – 2021. – Т.31. – №2. – С.226–236.
188. Черменский А.Г. Применение таргетной терапии лумакафтором/ивакафтором у больных муковисцидозом / Черменский А.Г., Гембицкая Т.Е., Орлов А.В., Махмутова В.Р. // Медицинский совет. – 2022. – Т.16. – №4. – С.98–106.
189. Муковисцидоз: монография / Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Кондратьева Е. И. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2021. – 680с.
190. Чернуха М.Ю. Применение системы MALDI Biotyper и алгоритма микробиологической диагностики для идентификации неферментирующих микроорганизмов, выделенных из дыхательных путей у больных муковисцидозом / Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Жуховицкий В.Г., Аветисян Л.Р., Кулястова Д.Г., Сиянова Е.А., Медведева О.С., Поляков Н.Б., Соловьев А.И., [и др.] // KMAX. – 2017. – №4. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-sistemy-maldi-biotyper-i-algoritma-mikrobiologicheskoy-diagnostiki-dlya-identifikatsii-nefermentiruyuschih> (дата обращения: 19.09.2024).

191. Li Z. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis / Li Z., Kosorok M.R., Farrell P.M., [et al.] // JAMA. – 2005. – V.293. – №5. – P.581-8.
192. Lebecque P. Towards zero prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis / Lebecque P., Leal T., Zylberberg K., Reyhler G., Bossuyt X., [et al.] // J Cyst Fibros. – 2006. – V.5. – №4. – P.237-44.
193. Bianconi I. Persistence and Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal Genomic Study / Bianconi I., D'Arcangelo S., Esposito A., Benedet M., Piffer E., [et al.] // Front Microbiol. – 2019. – V.9. – P.3242.
194. Sadikot R.T. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia / Sadikot R.T., Blackwell T.S., Christman J.W., Prince A.S. // J Respir Crit Care Med. – 2005. – V.171. – №11. – P.1209-23.
195. Воронина О. Л. *Pseudomonas aeruginosa*. Ассистенты и конкуренты в микробиоме инфицированных легких больных муковисцидозом / Воронина О. Л., Рыжова Н. Н., Кунда М. С., [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Том 15. – №2. – С.186-191.
196. Alcalde-Rico M. Role of the Multidrug Resistance Efflux Pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Response / Alcalde-Rico M., Olivares-Pacheco J., Alvarez-Ortega C., Camara M., Martinez J.L. // J. Frontiers in Microbiology. – 2018. – V.9. – P.2752.
197. Сиянова Е.А. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa* / Сиянова Е.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Прилипов А.Г., Усачев Е.В., Кондратьева Е.И., Припутневич Т.В., [и др.] // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2018. – Том 97. – №2. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/monitoring-hronicheskoy-infektsii-legkih-u-bolnyh-mukovistsidozom-vyzvannoy-bakteriyami-pseudomonas-aeruginosa> (дата обращения: 04.05.2024).